

Charakterisierung des Virulenzfaktors PilY1 aus *Legionella pneumophila*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig



zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Julia Sophie Hoppe
aus Braunschweig

1. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. Michael Steinert
2. Referentin oder Referent:	Prof. Dr. Petra Dersch
eingereicht am:	17.10.2016
mündliche Prüfung (Disputation) am:	06.02.2017
Druckjahr	2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Hoppe J, Ünal CM, Thiem S, Grimpe L, Goldmann T, Gaßler N, Richter M, Shevchuk O and Steinert M. PilY1 Promotes *Legionella pneumophila* Infection of Human Lung Tissue Explants and Contributes to Bacterial Adhesion, Host Cell Invasion, and Twitching Motility. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:63. doi: 10.3389/fcimb.2017.00063 (2017)

Shevchuk, O., Pägelow, D., Rasch, J., Döhrmann, S., Günther, G., Hoppe, J., Ünal, C.M., Bronietzki, M., Gutierrez, M.G., Steinert, M. Polyketide synthase (PKS) reduces fusion of *Legionella pneumophila*-containing vacuoles with lysosomes and contributes to bacterial competitiveness during infection. *Int J Med Microbiol.* 304.8 1169-1181 (2014).

Tagungsbeiträge

Hoppe, J., Shevchuk, O., Ünal, C.M., Gutierrez, M.G., Steinert, M.: Role of the *Legionella pneumophila* PilY1 in adhesion to host cells and intracellular infection. (Vortrag) Jahrestagung der Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Marburg (2015).

Posterbeiträge *

Hoppe, J., Shevchuk, O., Rasch, J., Krauze, J., Gutierrez, M.G., Steinert, M.: Role of PilY1 in adhesion to host cells and intracellular infection of *Legionella pneumophila*. Jahrestagung der Association for General and Applied Microbiology und der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (VAAM/DGHM), Dresden (2014).

Hoppe, J., Shevchuk, O., Rasch, J., Gutierrez, M.G., Steinert, M.: PilY1 is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Rostock (2013).

Hoppe, J., Shevchuk, O., Rasch, J., Gutierrez, M.G., Steinert, M.: *Legionella pneumophila* PilY1 plays essential role in intracellular trafficking. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Hamburg (2012).

Die Definition von Wahnsinn ist, immer wieder
das Gleiche zu tun und andere Ergebnisse zu
erwarten.

Albert Einstein

Danksagungen

Bei **Prof. Dr. Michael Steinert** möchte ich ganz herzlich für das spannende Thema, die große wissenschaftliche Freiheit und seinen unerschöpflichen Optimismus während meiner Doktorarbeit danken. Danke, dass du an mich und PilY1 geglaubt hast, als ich mir nicht mehr so ganz sicher war.

Prof. Dr. Petra Dersch und **Prof. Dr. André Fleißner** möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und des Prüfungsvorsitzes danken.

Dr. Olga Shevchuk danke ich dafür, dass es PilY gibt! :) Olga, vielen, vielen Dank für deine Hilfe und Unterstützung, für die unermüdlichen Diskussionen über PilY und das nicht immer einer Meinung sein. Ich habe so viel von dir gelernt. Du bist für mich immer eine Inspiration fürs Forscherin sein!

Bei meinen Kooperationspartnern von der Universität Greifswald **Prof. Dr. Katharina Riedel**, **Dr. Stephan Fuchs**, **Dr. Daniela Zühlke** und **Florian Bonn** bedanke ich mich für die nette Aufnahme von den "Braunschweigerinnen" und für die Analyse der Sekretome sowie die Unterstützung bei den Experimenten.

Dr. Maximiliano Gutierrez und **Marc Bronietzki** danke ich für die Möglichkeit und Unterstützung bei den Kolokalisationsstudien der Transposonmutanten. Marc, vielen Dank für deine vielen Tipps, ohne dich hätten Janine und ich aus den vielen Bildern niemals eine so "professionelle" Abbildung zaubern können. - Danke für deine Geduld! :)

Bei **Dr. Matthias Richter**, **Dr. Johannes Haag** und **Prof. Dr. Nikolaus Gaßler** vom Städtischen Klinikum Braunschweig möchte ich für die Bereitstellung des Lungengewebes bedanken.

Dr. Jörn Krause, **Dr. Andrea Scrima** und **Claudia Hanko** möchte ich für die Expression und Reinigung sowie für die Hilfe bei den Thermophorese Experimenten danken. PilY hatte es uns, wie immer, nicht besonders leicht gemacht - trotzdem vielen Dank fürs nicht aufgeben!

Bei **Dr. Eva Schunder** und **Dr. Ann Kathrin Heroven** möchte ich mich für die vielen praktischen Tipps und Tricks für die Klonierung des *pilY1* Knockouts bedanken.

Dr. Tristan Nicke und **Dr. Sofia Magnowska** danke ich für die Starthilfe und die Protokolle zur Membranisolation. - auch wenn ich am Ende alles irgendwie doch ganz anders gemacht habe :).

Ein ganz großes Dankeschön geht natürlich an die gesamte AG Steinert und dem Institut für Mikrobiologie, vor allem für die tolle Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Hilfe. Insbesondere möchte ich mich bei **Gabi, Daniela, Simone, Freddi, Jana, Chris, Jens, Corina, Barbara, Qunxiu, Simon, den großen und den kleinen Dennis, Alina, Stefan, Natascha, Sandra, Nina, Sarah, Anne, Katharina, Kristin und Christin** für die schöne Zeit miteinander bedanken. Es gibt einfach so viele Geschichten, an die ich mich immer gerne erinnern werde. Ganz besonders möchte ich hier

auch nochmal Gabi danken. Gabi, ich weiß du möchtest es bestimmt nicht gerne hören, aber du die weltallerbeste Kummerkastentante und ein echter Fels in der Brandung! Danke fürs zu hören!

Ein ganz großer Dank geht auch **Janine Rasch** als Komplizin bei so vielen Abenteuern, wie dem Überleben mit blauen Säcken, beim borgen von Antikörpern oder bei Ethylacetatschlachten. Außerdem vielen, vielen Dank für das wegquatschen von Schreibbolkaden und den Beistand an Pommestagen. Wer hätte gedacht, dass ich es mal vermissen würde ein Kellerkind zu sein...

Can Ünal danke ich dafür, dass er ENDLICH gutes Klonierungs-Karma in unser Labor gebracht hat. Das war gerade noch rechtzeitig! Und ein großes Dankeschön auch für die vielen hilfreichen Diskussionen über PilY und allen möglichen Experimenten! Außerdem möchte ich dir für deinen Beistand bei meinem VAAM Vortrag danken. -ohne das tiefenentspannte DrÜnal Gesicht wäre das sicher nicht so gut gegangen...

Stefanie Krüger (das bleibst du einfach für mich! :)) danke ich, weil sie einfach immer da ist, wenn man sie braucht und weil sie einfach immer an alle denkt. Danke, dass du immer, YEB, steriles PBS oder Zellen für mich hattest, wenn ich es mal wieder verschusselt habe. Und danke für das Taxi und die netten Gespräche über alles Mögliche. Warum haben wir das nicht schon viel eher gemacht?!

Bei **Hannes Beims** möchte ich mich dafür bedanken, dass er einfach immer für eine Kaffeepause zu haben ist und kein Thema zu verrückt war, um nicht diskutiert zu werden. Mit dir habe ich immer gerne über Gott und die Welt gelästert. :)

Hilger Jagau, danke, dass du einfach alles reparieren kannst was wir kaputt experimentiert oder gespielt haben und immer alles in Schuss hältst. Die AG Raffen und Horten braucht dich!

Louisa Grimpe und Lina Scheithauer, vielen Dank dafür, dass ihr das Projekt PilY1 weiterführt und mir bei dem Paper helft. Pili-Mädchen müssen zusammenhalten! :)

Elena Fuchs (weil du einfach der Fuchs bist!) und **Ann-Kathrin Meyer** (Anka!!!) danke ich von ganzen Herzen, dass sie mich bei der Achterbahnfahrt Doktorarbeit begleitet und mit mir gelacht, geweint und geflucht haben. Es gab einige Male, an denen ich geschworen habe nie mehr wieder zu kommen und nur wegen euch stand ich am nächsten Tag trotzdem wieder im Labor! Ihr seid einfach die allerbesten. Niemals ohne euch! ...und die Socken und die T-Shirts!

Und an alle anderen meiner aller liebsten und besten Menschen, ich weiß, ich hab gejammert, zu früh gejubelt, überdramatisiert und dann doch wieder alles besser gewusst. Danke für eure Geduld mit mir! - wehe ihr sagt jetzt: "Ich habs doch gleich gewusst."!

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	III
Danksagungen.....	V
1. Zusammenfassung	11
2. Summary	13
3. Einleitung	15
3.1. <i>Legionella pneumophila</i>	15
3.1.1. Biologie von <i>L. pneumophila</i>	15
3.1.2. Virulenzfaktoren von <i>Legionella pneumophila</i>	18
3.1.3. Intrazellulärer Infektionszyklus von <i>L. pneumophila</i>	27
3.1.4. <i>L. pneumophila</i> Mutanten mit Defekten in der Inhibition der phagolysosomalen Fusion.....	33
3.2. Typ IV Pili	34
3.2.1. Typ IV Pili in Gram-negativen Bakterien	35
3.2.2. Funktionen von Typ IV Pili in der Virulenz	39
3.2.3. Typ IV Pili von <i>L. pneumophila</i>	41
4. Zielsetzung	43
5. Material und Methoden	44
5.1. Geräte.....	44
5.2. Verbrauchsmaterialien	45
5.3. Kommerzielle Kits, Software und Datenbanken, Vektoren, Oligonukleotide, Enzyme, Größenstandards sowie Antikörper.....	46
5.3.1. Kommerzielle Kits	46
5.3.2. Software und Datenbanken.....	47
5.3.3. Vektoren	47
5.3.4. Oligonukleotide	48
5.3.5. Enzyme	49
5.3.6. Größenstandards (DNA und Proteine).....	49
5.3.7. Antikörper	50
5.4. Bakterienstämme und Zellen	51
5.5. Bakteriologische Methoden	52

5.5.1.	Kultivierung von Bakterien	52
5.5.2.	Kryokonservierung von Bakterien.....	53
5.5.3.	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	54
5.5.4.	Herstellung elektrokompeter <i>L. pneumophila</i> Zellen.....	55
5.5.5.	„Twitching Motility“	55
5.5.6.	„Sliding Motility“	55
5.6.	Zellbiologische Methoden	56
5.6.1.	Kultivierung von <i>D. discoideum</i>	56
5.6.2.	Kryokonservierung von <i>D. discoideum</i>	56
5.6.3.	Kultivierung von A549 Epithelzellen	57
5.6.4.	Splitten von A549 Epithelzellen	57
5.6.5.	Kultivierung von THP-1 Makrophagen	57
5.6.6.	Splitten von Makrophagen	57
5.6.7.	Ausdifferenzieren von THP-1 Makrophagen	58
5.6.8.	Kryokonservierung von tierischen Zelllinien	58
5.6.9.	Bestimmung der Zellzahl	59
5.7.	Infektionsbiologische Methoden	59
5.7.1.	Kolokalisationsstudien von LCVs in <i>D. discoideum</i>	59
5.7.2.	Infektionsassay mit <i>D. discoideum</i>	60
5.7.3.	Infektionsassay mit THP-1 Makrophagen	61
5.7.4.	Infektionsassay A549 Epithelzellen	61
5.7.5.	Infektionen in „Human Lung Tissue Explants“ (HLTEs)	62
5.7.6.	Invasionsassay in <i>D. discoideum</i>	63
5.7.7.	Adhäsions- und Invasionsassay in A549 Epithelzellen	63
5.7.8.	Adhäsions- und Invasionsassay in THP-1 Makrophagen	64
5.7.9.	Quantifizierung der Adhäsion und Invasion in THP-1 Makrophagen	64
5.8.	Molekularbiologische Methoden	65
5.8.1.	Isolierung genomischer DNA.....	65
5.8.2.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	66
5.8.3.	Agarosegelelektrophorese.....	67
5.8.4.	PCR	67

5.8.5.	Sequenzierung	69
5.8.6.	Herstellung von <i>pilY1 L. pneumophila</i> Deletionskonstrukten.....	69
5.8.7.	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	71
5.8.8.	Mutagenese des <i>L. pneumophila pilY1</i> Gens	71
5.8.9.	Komplementation des <i>L. pneumophila pilY1</i> Gens	72
5.8.10.	Klonierung des <i>pilY1</i> Gens zur rekombinanten Proteinproduktion	73
5.9.	Biochemische Methoden	74
5.9.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	74
5.9.2.	Isolation von Proteinen aus dem Kulturüberstand durch TCA Präzipitation	74
5.9.3.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	75
5.9.4.	Comassie Färbung von SDS Gelen	76
5.9.5.	Identifikation von Proteinen des Sekretoms mittels 2D-Gelelektrophorese.....	76
5.9.6.	Identifikation von Proteinen des Sekretoms mittels des Orbitrap™ Ionenfallen-Massenspektrometer.....	79
5.9.7.	Identifikation von Proteinen des Sekretoms mittels des Synapt Massenspektrometer ..	80
5.9.8.	Western Blot.....	81
5.9.9.	Lokalisation von PilY1 durch zelluläre Fraktionierung mit Triton X-100	82
5.9.10.	Analyse der PilY1 Expression mittels Westernblot	83
5.9.11.	Heterologe Expression und Reinigung der PilY1 Domäne	84
5.9.12.	Analyse der Ca ²⁺ -Interaktion von PilY1 durch Microscale Thermophorese.....	84
6.	Ergebnisse	86
6.1.	PilY1 wird in der transmissiven Phase von <i>L. pneumophila</i> exprimiert	86
6.2.	Das <i>L. pneumophila</i> PilY1 ist in der äußeren Membran lokalisiert.....	87
6.3.	PilY1 beeinflusst die Inhibition der phagolysosomalen Fusion in der <i>L. pneumophila</i> Infektion	88
6.4.	Beeinflussung des Sekretoms von <i>L. pneumophila</i> durch PilY1	89
6.5.	Das <i>L. pneumophila</i> PilY1 weist Homologien zu anderen Spezies auf	91
6.6.	Mutagenese zur funktionellen Analyse des <i>L. pneumophila pilY1</i>.....	93
6.6.1.	Deletionsmutagenese des <i>L. pneumophila pilY1</i> Gens	93
6.6.2.	Funktionelle Komplementation des <i>L. pneumophila pilY1</i> Gens	94
6.7.	PilY1 ist an der intrazellulären Replikation von <i>L. pneumophila</i> beteiligt	95
6.7.1.	PilY1 beeinflusst die intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i> in <i>D. discoideum</i> ...	95

6.7.2.	PilY1 beeinflusst die Pathogenität von <i>L. pneumophila</i> in HLTE Infektionen	96
6.7.3.	PilY1 beeinflusst die intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i> in humanen Makrophagen und Lungenepithelzellen	97
6.8.	PilY1 ist an der Initiierung der Interaktion zwischen <i>L. pneumophila</i> und der Wirtszelle beteiligt.....	98
6.8.1.	Die Invasion von <i>L. pneumophila</i> in <i>D. discoideum</i> ist abhängig von PilY1	99
6.8.2.	Die Adhäsion und Invasion von <i>L. pneumophila</i> in humane Makrophagen ist abhängig von PilY1	100
6.8.3.	Die Adhäsion und Invasion von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen ist abhängig von PilY1	102
6.9.	PilY1 ist an der Oberflächentranslokation von <i>L. pneumophila</i> beteiligt.....	103
6.9.1.	PilY1 beeinflusst die Oberflächenbewegung „Twitching Motility“	104
6.9.2.	PilY1 beeinflusst die Oberflächenbewegung „Sliding Motility“	105
6.10.	Calciumbindung des <i>L. pneumophila</i> PilY1 Proteins.....	107
6.10.1.	Struktur der putativen Ca ²⁺ -Bindungsdomäne des <i>L. pneumophila</i> PilY1	107
6.10.2.	Rekombinante Produktion der <i>L. pneumophila</i> PilY-Domäne	108
6.10.3.	Die Ca ²⁺ -Interaktion der <i>L. pneumophila</i> PilY1 Domäne	109
7.	Diskussion	111
7.1.	PilY1 ist ein neuer Virulenzfaktor von <i>L. pneumophila</i>	111
7.2.	PilY1 beeinflusst die Pathogenese von <i>L. pneumophila</i> in der Infektion von humanem Lungengewebe	117
7.3.	PilY1 ist an der Oberflächentranslokation und Transmission von <i>L. pneumophila</i> beteiligt.....	119
7.4.	PilY1 trägt als Adhäsionsfaktor zur Initiation der Infektion von <i>L. pneumophila</i> bei .	123
7.5.	PilY1 ist beeinflusst in die intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i>	125
7.6.	Ausblick	128
8.	Anhang	131
8.1.	Vektorkarten	131
8.2.	Sekretom Analyse der <i>L. pneumophila pilY1</i> negativen Mutante	132
8.3.	Abkürzungsverzeichnis	134
8.4.	Literaturverzeichnis	136
8.5.	Abbildungsverzeichnis	167
8.6.	Tabellenverzeichnis	168

1. Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist, als fakultativ intrazelluläres Bakterium, der Erreger der Legionärskrankheit, einer atypischen Lungenentzündung. Im Rahmen der humanen Lungeninfektion adhärieren die Bakterien an die alveolare Oberfläche und replizieren dort vorwiegend in den durch die Inflammation eingewanderten Makrophagen. Von zentraler Bedeutung für die Pathogenität von *L. pneumophila* ist die Eigenschaft, die endolysosomale Degradation durch die Wirtszelle zu inhibieren. Daraus resultierend, ist sowohl die Abwesenheit von endolysosomalen Markern, als auch die Assoziation des endoplasmatischen Retikulums (ER) charakteristisch für die *Legionella*-containing vacuoles (LCVs) in den frühen Phasen der Infektion.

In vorangegangenen Arbeiten konnten *L. pneumophila* Transposonmutanten mit Defekten in der Inhibition der phagolysosomalen Fusion identifiziert bzw. selektiert werden. Einige dieser Mutanten wiesen Insertionen in dem Gen *pilY1* auf und zeigten eine signifikant erhöhte lysosomale Kolo-kalisation. Das *L. pneumophila* PilY1, insbesondere der C-Terminus, weist starke Homologien zu dem PilY1 von *Pseudomonas aeruginosa* sowie zu den PilC Proteinen von pathogenen *Neisseria* spp. auf. Diese Proteine beeinflussen unter anderem die Typ IV Pilus-Biogenese und Stabilität. Außerdem konnte am N-Terminus eine von Willebrand Faktor A (vWFA) Domäne identifiziert werden. Von Willebrand Faktor A Domänen liegen hauptsächlich bei extrazellulären eukaryotischen Proteinen vor und sind vorwiegend an der Zell-Zell Interaktion beteiligt. Insbesondere bei *P. aeruginosa* wird zudem eine mögliche Funktion der vWFA Domäne als ein Mechanosensor diskutiert. Hier ist PilY1 an Regulation der Oberflächen-induzierten Virulenz beteiligt.

Durch zelluläre Fraktionierung und Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass PilY1 an der äußeren Membran von *L. pneumophila* lokalisiert ist und ausschließlich in der transmissiven Wachstumsphase exprimiert wird. Diese Phase zeichnet sich durch die vermehrte Expression von Virulenzfaktoren aus, um eine erneute Wirtszellinfektion zu gewährleisten.

Infektionsexperimente mit humanem, explantierten Lungengewebe (HLEs), THP-1 Makrophagen sowie A549 Epithelzellen zeigten die Beteiligung von PilY1 an der Adhäsion und Invasion sowie der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila*. Desweiteren trägt PilY1 zu der bakteriellen Oberflächentranslokation, Twitching und Sliding Motility bei. Dies könnte auf eine mögliche Beteiligung von PilY1 an der Migration von *L. pneumophila* innerhalb des infizierten Lungengewebes hindeuten. Funktionelle Komplementationsexperimente mit verkürzten PilY1 Varianten demonstrierten, dass in erste Linie die C-

terminale PilY-Domäne die vorliegenden Oberflächenphänotypen vermittelt. Hingegen bleibt die regulatorische Funktion der vWFA Domäne hypothetisch.

In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus *P. aeruginosa* und pathogenen *Neisseria* spp. konnte für *L. pneumophila* eine putative Ca^{2+} -Bindungsdomäne identifiziert werden. Jedoch war keine signifikante Ca^{2+} -Bindung der C-terminalen PilY-Domäne messbar. Sofern bedarf die Ca^{2+} -Interaktion, sowie der mögliche Einfluss auf die Typ IV Pilus-Funktion, weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend konnte PilY1 als neuer Adhäsionsfaktor identifiziert werden, welcher nicht nur für die bakterielle Internalisierung, sondern auch an der erfolgreichen Etablierung der LCV beteiligt ist, indem wahrscheinlich eine enge Wirtszellinteraktion für die effiziente Effektor-Translokation hergestellt wird.

2. Summary

Legionella pneumophila is a facultative intracellular bacterium which causes a severe form of pneumonia - Legionnaires' disease. During human lung infection the bacteria adhere to the alveolar lining and replicate intracellularly within recruited macrophages. A key feature of *L. pneumophila* pathogenicity is the ability to reprogram the degradative intracellular trafficking. Consequently, the *Legionella*-containing vacuoles (LCVs) exclude endocytic and lysosomal markers and associate with the rough endoplasmic reticulum at the early stage of infection.

In previous work *L. pneumophila* transposon mutants that are attenuated in escaping the lysosomal degradation have been selected. One of the mutants shows a significantly higher co-localization with the lysosomal compartment and exhibits transposon insertions in the *pilY1* gene. The *L. pneumophila* PilY1 protein, which shares high homology to the virulence factor PilY1 of *Pseudomonas aeruginosa* and PilC of pathogenic *Neisseria* spp, represents a comparable domain composition. It possesses an N-terminal von Willebrand factor A (vWFA) domain and a PilY1 domain at the C-terminus. The vWFA domain is involved in cell adhesion and is originally found in extracellular eukaryotic proteins whereas the PilY1 domain is proposed to influence type IV pilus biogenesis and stability. Beyond that, in *P. aeruginosa* the vWFA domain is discussed to function as a mechanosensor in order to induce surface dependent virulence.

By cellular fractionation and Western blotting experiments the *L. pneumophila* PilY1 could be assigned as outer membrane protein that is only expressed during the transmissive stationary growth phase. This growth phase is characterized by enhanced virulence factor expression in order to promote transmission to new host cells.

Infection assays with human lung tissue explants (HLTEs), THP-1 macrophages and A549 epithelial cells demonstrated that PilY1 not only contributes to the intracellular survival and replication but specifically to adhesion and invasion of host cells. Since PilY1 also promotes bacterial surface motility of *L. pneumophila*, like twitching motility and sliding motility, a putative contribution of this virulence factor on bacterial dissemination within infected lung tissue could be possible. Re-complementation variants of PilY1-negative mutants revealed that the C-terminal PilY domain was essential to restore these multiple surface behaviors, while a mechanosensitive regulatory function of the vWFA domain remains hypothetical.

Consistent to the findings in *P. aeruginosa* and pathogenic *Neisseria* spp. a potential *L. pneumophila* PilY1 Ca^{2+} binding motive could be identified. But a significant Ca^{2+}

interaction of the PilY1 domain as well as its possible regulatory function in type IV pilus biogenesis could not be demonstrated and needs further investigation.

In summary, it can be proposed that PilY1 functions as adhesion factor, which not only influences the bacterial uptake by host cells, but also the successful establishment of the early LCV by providing close cell-cell contact for effective effector translocation.

3. Einleitung

3.1. *Legionella pneumophila*

Der Name *Legionella pneumophila* geht zurück auf den ersten großen registrierten Krankheitsausbruch 1976 in Philadelphia (USA). Bei einem Treffen der amerikanischen Kriegsveteranen (American Legion Convention) im Belevue Stratford Hotel erkrankten 5 % der 4400 Teilnehmern an einer atypischen Lungenentzündungen, verursacht durch einen bisher unbekannten Erreger. 15 % der erkrankten Teilnehmer starben an ihrer Infektion. Im Jahr 1977 konnten Joseph McDade und Charles Shepard den unbekannten Mikroorganismus in Meerschweinchen rekultivieren und identifizieren. In Anlehnung an den historischen Krankheitsausbruch wurde der Erreger *Legionella pneumophila* genannt (Fraser *et al.*, 1977; McDade *et al.*, 1977)

3.1.1. Biologie von *L. pneumophila*

Beschreibung und Taxonomie

L. pneumophila ist ein Gram-negatives, aerobes und unipolar begeißeltes Stäbchenbakterium. Es hat eine Länge von 2-20 µm und einem Durchmesser von 0,3-0,9 µm, wobei seine Morphologie in Abhängigkeit der Kulturbedingungen variieren kann (siehe Abbildung 3.1) (Katz *et al.*, 1984; Diederer, 2008). *L. pneumophila* ist ein chemoorganotrophes Bakterium, welches als primäre Energiequelle vor allem Aminosäuren nutzt. Neben den Aminosäuren stellt auch Eisen einen kritischen Faktor für das Wachstum der Bakterien dar (Reeves *et al.*, 1981; Eylert *et al.*, 2010). Die Gattung *Legionella* gehört der Familie der *Legionellaceae* an, welche phylogenetisch zu den γ-Proteobakterien zählen (Benson and Fields, 1998). Bislang werden 62 Spezies und 79 Serogruppen den *Legionellaceae* zugeordnet (Cazalet *et al.*, 2004) Robert Koch Institut, 2013). Zur Gattung *Legionella* zählen zusätzlich die *Legionella like Amoebal Pathogens* (LLAP), die eine große genomische Ähnlichkeit zu *Legionella* aufweisen (Adeleke *et al.*, 2001). Desweiteren ist eine Dauerform von *L. pneumophila* beschrieben, der *viable but not culturable* (VBNC) Status. Dieser wird hervorgerufen durch abiotischen Stress, wie extreme Temperaturen oder Nährstoffmangel. Eine Kultivierung der VBNCs auf Standardnährmedien ist nicht möglich. Die Rückführung der Bakterien in eine kultivierbare Form kann bisher nur durch die Infektion von Amöben, wie *Acanthamoeba castellanii* erreicht werden. Eine anschließende Infektion von humanen Makrophagen oder Epithelzellen durch die reanimierten Bakterien ist jedoch möglich (Steinert *et al.*, 1997;

Epalle *et al.*, 2015). Ferner weist das Genom von *L. pneumophila* eine Größe von 3,3 bis 3,5 Mb und einen GC-Gehalt von 38 % auf.

Lebensraum und Ökologie

L. pneumophila kommt natürlicherweise in Süß- und Salzwasserhabitaten sowie in feuchten Böden vor. Da sie sich unter natürlichen Bedingungen nicht extrazellulär im Wasser vermehren können, parasitieren die fakultativ intrazellulären Bakterien in verschiedenen Protozoen oder bilden kommensale Beziehungen (siehe Abbildung 3.1). Zu ihren natürlichen Wirten gehören mit Ciliaten und Amöben insgesamt 14 Spezies, wie *Hartmanella*, *Tetrahymena* oder *Acanthamoeba* (Harb *et al.*, 2000; Molmeret *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 2009). Die Replikation in Protozoen schützt *L. pneumophila* vor feindlichen Umweltbedingungen wie starken pH-Wert-Änderungen, hohen Temperaturschwankungen und UV-Strahlung. Ferner wird die Resistenz gegen Biozide, Antibiotika und osmotischem Stress erhöht. Eine weitere Adaption an die Umwelt stellt die Besiedlung von Biofilmen dar. Diese ermöglichen die Rekrutierung von freilebenden Protozoen zur intrazellulären Vermehrung (Alleron *et al.*, 2008; Declerck, 2010). Durch die enge Interaktion zwischen *L. pneumophila* und seinen eukaryotischen Wirten ist ein Spektrum an Virulenzfaktoren entstanden, infolge dessen *L. pneumophila* humane Makrophagen infizieren kann (Steinert *et al.*, 2002).

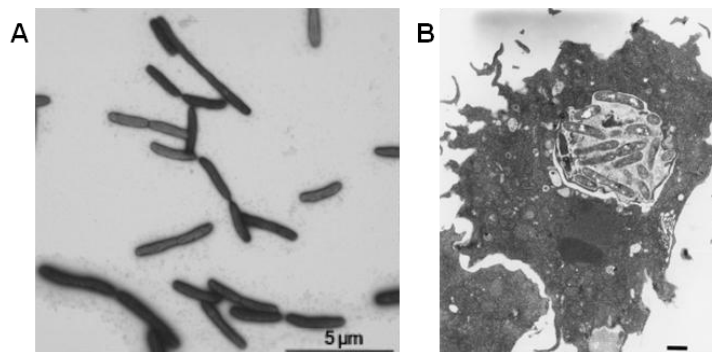


Abbildung 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila* und *D. discoideum*. (A) Aufnahme in Negativkontrastierung von *L. pneumophila* Corby. Maßstab=5 µm (Drawert, Frederike. 2013). (B) Infektion *D. discoideum* mit *L. pneumophila* 48 h post Infektion. Maßstab 0=1 µm. (Hägele *et al.*, 2000).

Legionellose

Zu einer Infektion mit *Legionella* kommt es in erster Linie durch das Einatmen von *Legionella*-haltigen Aerosolen über kontaminierte Wassersysteme (Fraser *et al.*, 1977; Fraser, 1980). Die Ausprägung einer Legionellose kann bei Menschen zwei unterschiedliche Formen annehmen. Das Krankheitsbild äußert sich zum einen in einer schweren atypischen Pneumonie und wird dann als Legionärskrankheit bezeichnet. Die Legionärskrankheit zeichnet sich durch extrapulmonale Symptome, wie hohem Fieber,

Husten, Thorax-Schmerzen, einer Beeinträchtigung des zentralen Nervensystems mit Halluzinationen und Lethargie sowie Diarrhö und Harnverhaltung aus. Die Inkubationszeit beträgt dabei im Durchschnitt 6-7 Tage (Tsai *et al.*, 1979; Den Boer *et al.*, 2002; Greig *et al.*, 2004).

Die Pathologie der Legionärskrankheit zeichnet sich durch eine massive Einwanderung von Immunzellen wie Makrophagen und Neutrophilen in die infizierten Alveolen aus. Im Anschluss kommt es zu einer Schädigung des Lungenepithels und der Gewebeintegrität (Glavin *et al.*, 1979; Winn and Myerowitz, 1981). Der hervorgerufene Gewebeschaden ermöglicht die Ausbreitung der Infektion an angrenzende Alveolen bzw. andere Lungenlappen. In der Spätphase der Infektion kann *L. pneumophila* durch das Endothel in den Blutstrom gelangen, sich in den Lymphknoten und im Knochenmark ausbreiten, sowie Leber und Nieren infizieren (Watts *et al.*, 1980; Hambleton *et al.*, 1982; Theaker *et al.*, 1987). Ursächlich ist hier die Fähigkeit von *L. pneumophila*, sich in alveolaren Makrophagen und den Zellen des Lungenepithels zu vermehren (Horwitz and Silverstein, 1980; Mody *et al.*, 1993). Wobei Makrophagen die primären Wirtszellen repräsentieren und die Lungenepithelzellen, besonders zu Beginn der Infektion, eine Nische für die Replikation und Verbreitung im Lungengewebe darstellen (Mody *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1998; Jäger *et al.*, 2014).

Die zweite Form der Legionellose ist das Pontiac-Fieber. Diese milde und selbstlimitierende Variante der *L. pneumophila*-Infektion weist vor allem Symptome auf, die an eine Influenza-Erkrankung erinnern (Glick *et al.*, 1978; Edelstein, 2007). Das Pontiac-Fieber tritt in der Regel nach einer wesentlich kürzeren Inkubationszeit auf, und der Krankheitsverlauf dauert in der Regel 2-5 Tage. Die Ausprägung einer Lungenentzündung ist hierbei meist untypisch (Tossa *et al.*, 2006). Gernerell wird davon ausgegangen, dass das Pontiac-Fieber ebenfalls durch eine Inhalation von Aerosolen mit in der Umwelt vorkommenden *Legionella*-Spezies hervorgerufen wird. Dennoch ist die genaue Ursache und Pathologie der Erkrankung weitgehend ungeklärt (Edelstein, 2007; Cunha *et al.*, 2015).

Epidemiologie

Von mehr als 60 beschriebenen *Legionella*-Spezies wurden 19 als humanpathogene Stämme identifiziert (Joseph und Ricketts 2008; DSMZ, 2016). Ferner handelt es sich bei 90% bis 95% der Erkrankungen um eine Infektion mit *L. pneumophila*, wobei ca. 85% dieser Infektionen durch die Serogruppe 1 erfolgen. Diese lässt sich wiederum in 10 monoklonale Subtypen unterteilen. Insgesamt umfasst die Art *L. pneumophila* 16 Serogruppen (Yu *et al.*, 2002; Helbig *et al.*, 2002; Steinert *et al.*, 2007; Palusińska-Szyszk and Russa, 2009). Darüber hinaus wurden in Ländern wie Australien, Neuseeland und Schottland Infektion mit der Spezies *L. longbeachae* registriert (Whiley and Bentham,

2011; Potts *et al.*, 2013). Generell verfügen ältere Menschen, insbesondere Männer, sowie Raucher und immunsupprimierte Menschen, über ein höheres Infektionsrisiko (von Baum *et al.*, 2008; Phin *et al.*, 2014; ECDC's Annual Epidemiological Report 2013). Die Legionärskrankheit weist eine Letalität von ungefähr 8-12 % auf, wobei von einer höheren Letalitätsrate in den Risikogruppen auszugehen ist. (Dominguez *et al.*, 2009; RKI Epidemiologisches Bulletin 13/2015). In Deutschland erkranken jährlich rund 500 Menschen, jedoch wird eine relativ große Dunkelziffer angenommen. Im Fall des Pontiac-Fiebers wird ebenfalls von einer starken Untererfassung ausgegangen, dies ist auf die nicht definierten Diagnosekriterien sowie die diffusen Symptome dieser *Legionella*-Infektion zurückzuführen (Brodhun and Buchholz, 2011; Phin *et al.*, 2014).

Reservoir und Infektion

Zusätzlich zu den natürlichen Habitaten können *Legionella*-Spezies auch technische Wasserleitungssysteme besiedeln. Hier liegen mit Temperaturen zwischen 25 °C und 45 °C ideale Vermehrungsbedingungen vor. Außerdem ermöglicht ihre parasitische Lebensweise innerhalb von Protozoen beziehungsweise in Biofilmen eine Persistenz in diesen Leitungssystemen und bietet einen Schutz gegen etwaige Desinfektionsmaßnahmen (Thomas *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2010; Brodhun and Buchholz, 2011). So korrespondieren unter anderem Warmwassersysteme wie z.B. Kühltürme, Whirlpools, Sprinkleranlagen, Duschen oder Klimaanlage mit *Legionella* Infektionen (Lau *et al.*, 2013; Garcia *et al.*, 2013; Serrano-Suárez *et al.*, 2013). Allgemein, ist im Jahresverlauf eine Zunahme der Erkrankungszahlen in den Sommer- und Herbstmonaten zu verzeichnen. Dies ist auf die begünstigten Verhältnisse, wie wärmere Temperaturen und eine erhöhte Luftfeuchtigkeit, zurückzuführen, wodurch das Wachstum der Bakterien und das Überleben in den Aerosolen begünstigt wird (Berendt, 1980; Ricketts *et al.*, 2009).

Grundsätzlich kann eine Infektion des Menschen nur durch die Inhalation *Legionella*-haltiger Aerosole aus kontaminierten Wassersystemen erfolgen. Eine Übertragung der Legionärskrankheit von Mensch zu Mensch wurde bislang nicht beobachtet (Steinert *et al.*, 2002). Das Infektionsrisiko ist hierbei abhängig von der Dauer und Art der Exposition, aber auch von der bakteriellen Belastung des Wassers sowie der Virulenz des kolonisierenden *Legionella*-Stammes (Cunha *et al.*, 2015). Zu den häufigsten *Legionella* Infektionen zählen die ambulant erworbenen Infektionen im privaten oder beruflichen Umfeld. Es können aber auch reiseassoziierte oder nosokomiale Infektionen mit *Legionella*-Spezies auftreten (Stout *et al.*, 1982; Ricketts *et al.*, 2010; Allen *et al.*, 2012).

3.1.2. Virulenzfaktoren von *Legionella pneumophila*

Bei *L. pneumophila* handelt es sich um ein sich intrazellulär vermehrendes Bakterium, welches für seine Vermehrung unterschiedliche Wirtszellen nutzen kann, daher besitzt es

ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren. Die meisten Virulenzfaktoren dienen dem intrazellulären Überleben sowie der Replikation. Dies betrifft vorrangig die Etablierung eines spezialisierten Phagosoms, der *Legionella*-containing vacuole (LCV), sowie der Inhibition des lysosomalen Abbaus (Horwitz, 1983a; Horwitz, 1984). Eine besondere Rolle in der *L. pneumophila* Pathogenität nehmen die Sekretionssysteme ein, diese sind für den Transport von Effektorproteinen in die Wirtszelle verantwortlich (Berger and Isberg, 1993; Vogel *et al.*, 1998; Segal *et al.*, 1998). Die wichtigsten Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*, sowie deren Funktionen, sollen im Folgenden genauer erörtert werden.

Oberflächenfaktoren

Wichtige Virulenz-assoziierte Oberflächenstrukturen von *L. pneumophila* sind unter anderem LPS, Außenmembranproteine, Außenmembranvesikel sowie Flagellen und Pili. Sie sind vorwiegend an der Adhärenz und der Invasion in die Wirtszelle beteiligt, können aber auch in der intrazellulären Replikation von Bedeutung sein.

Zu den wichtigen Faktoren für die Adhärenz und Invasion zählen unter anderem das Außenmembranprotein MOMP, Toxin RtxA, das Integrin Analogon LaiA, das Chaperon Hsp60 und das Protein Lcl sowie Typ IV Pili. Das Außenmembranprotein MOMP (major outer membrane protein) vermittelt die Internalisierung der Bakterien über das Komplementsystem. Hierbei kommt es zu einer Bindung der Opsonierungsfaktoren C3b und C3bi an das oberflächenassoziierte MOMP. Der an der Außenmembran entstandene MOMP-C3-Komplex vermittelt anschließend über die Bindung an die Komplement-Rezeptoren CR1 und CR3 die Aufnahme von *L. pneumophila* (Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990; Krinos *et al.*, 1999). Das RtxA Protein ist an der Adhäsion und Invasion von *L. pneumophila* in humane Monozyten und Epithelzellen sowie in Amöben wie *A. castellanii* beteiligt. Darüber hinaus zeigen *rtxA* Mutanten Defekte in der intrazellulären Replikation in Monozyten und Amöben, sowie eine verringerte Virulenz in A/J Mäusen. Dieser duale Phänotyp ließ sich in Amöben auf eine vermehrte Fusion mit den Lysosomen zurückführen. (Cirillo *et al.*, 2000; Cirillo *et al.*, 2001; Cirillo *et al.*, 2002). RtxA wird über das Typ I Sekretionssystem sezerniert und gehört zu der Familie der „repeats in structural toxin“ (RTX) Proteine. Hierbei handelt es sich vornehmlich um porenbildende Zytotoxine. Eine porenbildende Funktion des *Legionella* RtxA ist daher auch in Makrophagen nachweisbar. Diese Funktion wird der C-terminalen Domäne des Proteins zugeschrieben, hingegen scheint der N-terminale Bereich an der Adhäsion beteiligt zu sein (Cirillo *et al.*, 2001; D'Auria *et al.*, 2010; Fuche *et al.*, 2015). Das LaiA Protein von *L. pneumophila* weist große Homologien zu dem Integrin Analogon von *Saccharomyces cerevisiae* auf und zeigt Effekte in der Adhäsion und Invasion in humane Lungenepithelzellen sowie im A/J Mausmodell eine verminderte Virulenz (Chang *et al.*, 2005). Das Oberflächen assoziierte

Chaperon oder „Heat Shock“ Protein Hsp60 ist als „Moonlighting“ Protein ebenfalls an der Wirtszellinteraktion beteiligt und beeinflusst die Invasion von *Legionella* in Hela Zellen (Garduño *et al.*, 1998). Das Lcl Protein (*Legionella* collagen-like protein) verfügt über GXY „collagen-like repeats“. Es bindet an Glycosaminoglycane (GAGs) und fungiert als Adhäsion in der Interaktion mit Lungenepithelzellen. Ferner ist es an der Biofilmbildung und Autoaggregation von *L. pneumophila* beteiligt (Vandersmissen *et al.*, 2010; Duncan *et al.*, 2011; Mallegol *et al.*, 2012; Abdel-Nour *et al.*, 2014).

Die Flagelle ist als Virulenzfaktor nicht nur wichtig für Motilität, sondern auch für die Adhäsion und Invasion. Sie besteht aus der vom *flaA*-Gen codierten Untereinheit Flagellin. Nicht-flagellierte $\Delta flaA$ Mutanten weisen eine verringerte Invasionseffizienz in Amöben und humanen Lungenepithelzellen, HL-60 Zellen, auf (Dietrich *et al.*, 2001; Heuner *et al.*, 2002). Darüber hinaus spielen die Typ IV-Pili eine wichtige Rolle bei der komplementunabhängigen Aufnahme von *L. pneumophila* in Makrophagen und Lungenepithelzellen (Stone and Abu Kwaik, 1998). Ihre Funktion in der Pathogenität von *L. pneumophila* wird in Abschnitt 3.2.3 näher beschrieben.

Neben der Adhäsion an Wirtszellen können Oberflächenproteine auf vielfältige Weise mit der Virulenz von *L. pneumophila* korrelieren. So ist das Mip-Protein (macrophage infectivity potentiator) notwendig für die intrazelluläre Replikation in Makrophagen, Epithelzellen und Amöben. Im Meerschweinchen-Modell zeigen Mip-defiziente Stämme eine attenuierte Virulenz (Cianciotto and Fields, 1992; Wintermeyer *et al.*, 1995). Das Mip Protein ist mit der äußeren Membran von *L. pneumophila* assoziiert, jedoch nicht über Transmembrandomänen darin verankert. So konnte Mip bei Infektionen mit *A. castellanii* ebenfalls an der LCV Membran detektiert werden (Helbig *et al.*, 2001; Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001; Galka *et al.*, 2008). Ferner verfügt Mip über eine Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase) Aktivität, dadurch ist eine Bindung an die Bestandteile der extrazellulären Matrix von Lungenepithelzellen, insbesondere an die Collagen typen I, II, III, IV und VI möglich sowie die Transmigration durch ein *in vitro* Lungenepithelmodell (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2007). Mip kann so an die NC1 Domäne des humanen Collagen IV $\alpha 1$ binden (Ünal *et al.*, 2011). Zusätzlich ermöglicht diese Collagen-Interaktion eine Kolonisierung von Nematoden, wie *Caenorhabditis elegans* (Rasch *et al.*, 2016). Außerdem könnte Mip als PPIase die Aktivität von sezernierten Effektorproteinen regulieren (Debroy *et al.*, 2006). Darüber hinaus stellt eine Inhibition der PPIase Domäne von Mip einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe dar (Ünal and Steinert, 2014; Rasch *et al.*, 2014; Rasch *et al.*, 2015).

Die Lipopolysaccharidhülle (LPS-Hülle) von *L. pneumophila* weist im Gegensatz zu anderen Gram-negativen Bakterien eine einzigartige Struktur auf. Durch die großen Anteile von O- und N-Acetyl Gruppen ist das LPS sehr hydrophob. Diese starke Hydrophobizität

beeinflusst die Aerosol-abhängige Infektion mit *L. pneumophila* (Helbig, Lück, *et al.*, 1995). Ferner besteht die O-Kette des *L. pneumophila* LPS aus dem Homopolymer 5-acetamido-7-acetamido-8-O-acetyl-5,7,9-tetradexoyl-glycero-d-galacto-nonulosonic-säure (Legio-aminsäure), die keine Hydroxylgruppen haben (Palusińska-Szyszk and Russa, 2009). Das Lipid A, welches das LPS in der Außenmembran verankert, besteht aus ungewöhnlich langkettigen und verzweigten Fettsäuren. Im Vergleich zu anderen Gram-negativen Bakterien verfügt das *L. pneumophila* Lipid A über kaum endotoxische Wirkung in Monozyten (Neumeister *et al.*, 1998). Trotzdem ist das LPS für die *L. pneumophila*-Infektion von Bedeutung, da es zur Inhibition der phagolysosomalen Fusion beiträgt (Seeger *et al.*, 2010).

Neben dem LPS sind auch die Phospholipide der äußeren Membran von Bedeutung für Pathogenität von *Legionella*. Zu den Phospholipiden von *L. pneumophila* zählt unter anderem auch Phosphatidylcholin. Phosphatidylcholin ist eigentlich eine Komponente von eukaryotischen Zellmembranen, und deshalb nur in pathogenen Bakterien mit engen Wirtszellinteraktionen zu finden (Wilderman *et al.*, 2002; Sohlenkamp *et al.*, 2003). In *L. pneumophila* beeinflusst Phosphatidylcholin unter anderem die Adhäsion an Makrophagen sowie die Funktionalität des Dot/Icm Sekretionssystems und damit auch die intrazelluläre Replikation (Conover *et al.*, 2008). Darüber hinaus beeinflussen auch Phospholipasen die Virulenz von *L. pneumophila*, so wurden bislang 15 verschiedene Phospholipase A kodierende Gene identifiziert. Diese lassen sich in drei Gruppen unterteilen, die GDSL Familie, die Patatin-ähnlichen und die PlaB-ähnlichen Enzyme (Lang and Flieger, 2011). Die Phosphatidylcholin abbauenden Enzyme PlaA, PlaC und PlaD gehören zur GDSL Familie. Durch die Degradation von Wirtsmembranen bzw. den Abbau von Lysophosphatidylcholin (LPC) tragen sie während der Infektion zur Detoxifizierung sowie zur Signaltransduktion bei (Flieger *et al.*, 2000a; Flieger *et al.*, 2000b; Flieger *et al.*, 2002; Banerji *et al.*, 2005; Banerji *et al.*, 2008). Jedoch konnte noch keine Lypolytische Aktivität von PlaD identifiziert werden (Banerji *et al.*, 2008; Lang and Flieger, 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass PlaC durch die Protease ProA postranslational modifiziert und dadurch aktiviert wird (Lang *et al.*, 2012). Die Phospholipase PlaB zeigt keine signifikanten Homologien zu anderen charakterisierten Phospholipasen und stellt damit eine neue Proteinklasse dar. PlaB ist wichtig für die Virulenz und Vermehrung von *L. pneumophila* im Meerschweinchen Model und trägt durch die Degradation von Wirtsmembranen zur Delaminierung der Alveolen und damit zur Inflammation bei (Flieger *et al.*, 2004; Bender *et al.*, 2009; Schunder *et al.*, 2010). Ferner wird die Aktivität von PlaB konzentrationsabhängig reguliert. Bei PlaB Konzentrationen oberhalb des nanomolaren Bereichs kommt es zur Oligomerisierung und Inaktivierung der Proteine (Kuhle *et al.*, 2014).

Zur Ausschleusung von Effektoren bildet *L. pneumophila*, wie viele andere Gram-negative Bakterien, zusätzlich äußere Membran Vesikel (engl. *outer membrane vesicles*, OMVs), diese entstehen durch Ausstülpung und Abschnürung der äußeren Membran. Sie haben einen Durchmesser zwischen 100 und 250 nm und bestehen aus den Komponenten der äußeren Membran, wie dem LPS sowie den Bestandteilen des Periplasmas (Shevchuk *et al.*, 2011). Die *L. pneumophila* OMVs beinhalten eine große Anzahl von Virulenz-assoziierten Proteinen, dazu gehören unter anderem die Zink-Metalloprotease ProA und Mip. Außerdem verfügen die OMVs mittels Proteasen, Hydrolasen, und Phosphatasen über lipolytische und proteolytische Aktivitäten. So kann davon ausgegangen werden, dass OMVs einen Schutz möglicher Effektorproteine für extrazellulären Wirtsproteasen oder Nukleasen bzw. Wirtslipasen darstellen (Galka *et al.*, 2008; Ellis and Kuehn, 2010). Darüber hinaus können die OMVs, in Abhängigkeit von LPS oder anderen an die Außenmembran assoziierten Proteinen, die phagolysosomale Fusion inhibieren (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006). Es konnte auch gezeigt werden, dass OMVs an der Regulation der Inflammation beteiligt sind und somit die intrazelluläre Replikation von Makrophagen begünstigen (Jung *et al.*, 2016). Ferner können OMVs an die äußere Membran von Makrophagen binden und werden anschließend internalisiert (Jäger *et al.*, 2015). So ist bei einer Inkubation mit OMVs ein vergleichbarer Gewebeschaden zu beobachten, wie bei einer Infektion mit *L. pneumophila* (Jäger *et al.*, 2014).

Sekretionssysteme

L. pneumophila verfügt über mehrere Sekretionssysteme, dazu zählen das Typ I, II, IV und V Sekretionssystem. Für die pathogenen Eigenschaften sind insbesondere das Typ II Sekretionssystem (T2SS) und das TypIVB Sekretionssystem (T4BSS) wichtig. Diese Sekretionssysteme ermöglichen durch die Translokation von Effektorproteinen eine Manipulation des wirtszelleigenen Vesikeltransports und garantieren dadurch das intrazelluläre Überleben und die Replikation von *L. pneumophila*.

Das Typ I Sekretionssystem (T1SS) von *L. pneumophila* wird durch das *Iss*-Operon kodiert. Dieses T1SS setzt sich aus den Proteinen LssD/B und TolC zusammen. Ferner konnte gezeigt werden, dass das Toxin RtxA durch das T1SS sezerniert wird. Damit ist auch das T1SS an der Virulenz von *L. pneumophila* beteiligt, insbesondere in der frühen Phase der Infektion und der Internalisierung (Jacobi and Heuner, 2003; Fuche *et al.*, 2015).

Das *lsp* (*Legionella* secretion pathway) T2SS besteht aus 12 „core“ Proteinen. Zu den wichtigsten Komponenten gehören eine cytoplasmatische ATPase (LspE), eine aus Pseudopilinen bestehende Typ IV Pilus-ähnliche Struktur, welche das Periplasma durchspannt (LspG,H,I,J,K), und ein Sekretin (LspD), welches in der Außenmembran eine Pore bildet (Lammertyn and Anné, 2004). Basierend auf den jeweiligen Signalsequenzen findet

die Translokation der meisten T2SS Substrate durch das Sec-System oder über das Tat-Transportsystem in das Periplasma statt (Cianciotto, 2009). Außerdem ist die Prepilin Peptidase PilD essenziell für die Prozessierung der Pseudopiline (Liles *et al.*, 1999). Zudem zeigen PilD Mutanten mit Defekten in der T2SS eine verringerte intrazelluläre Replikation in Amöben und Makrophagen, Lungenepithelzellen sowie im Mausmodell (Liles *et al.*, 1998; Liles *et al.*, 1999; Rossier *et al.*, 2004; McCoy-Simandle *et al.*, 2011). Mittels des T2SS werden mehr als 25 Proteine sezerniert. Dazu gehören unter anderem Virulenzfaktoren wie RNasen, Aminopeptidasen, die Phospholipasen A und C, saure Phosphatasen und die SrrA Ribonuklease sowie die Zink abhängige Metalloprotease ProA (Rossier *et al.*, 2004; Lammertyn and Anné, 2004; Cianciotto, 2009; Tyson *et al.*, 2013). ProA kann aufgrund der geringen Spezifität zahlreiche Substrate degradieren, jedoch sind für die Aktivität von ProA zweiwertige Ionen, insbesondere Zink als Cofaktor, notwendig (Dreyfus and Iglewski, 1986; Keen and Hoffman, 1989; Quinn and Tompkins, 1989). So hat ProA eine zytotoxische Funktion und ist für Gewebse Nekrosen des Lungenepithels bei Meerschweinchen-Infektionen verantwortlich (Keen and Hoffman, 1989; Rechnitzer *et al.*, 1989; Moffat *et al.*, 1994).

Darüber hinaus sind das T1SS und das T2SS an der Motilität von *L. pneumophila* beteiligt. So werden amphipatische, diffusionsfähige Tenside sezerniert, welche eine Flagellen und Typ IV Pili unabhängige Bewegung, genannt Sliding Motility, ermöglichen (Stewart *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2011).

Das T4BSS von *L. pneumophila* Dot/Icm (defect in organelle trafficking/ intracellular multiplication) bildet einen Multiproteinkomplex, der die innere und äußere Membran durchspannt. Insgesamt sind an der T4BSS 27 Dot/Icm Proteine beteiligt (Marra *et al.*, 1992; Berger *et al.*, 1994; Vogel *et al.*, 1998). Dieser Multiproteinkomplex kann in zwei Subkomplexe aufgeteilt werden. Der Kernkomplex des T4BSS besteht aus den fünf Proteinkomponenten DotC, DotD, DotF/IcmB, DotG/IcmE und DotH/IcmK (Vincent *et al.*, 2006). DotH ist wahrscheinlich für die Bildung der Translokationspore verantwortlich und benötigt die Lipoproteine DotC und DotD zur Verankerung in die äußere Membran (Vincent *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2010). DotF und DotG sind in der inneren Membran lokalisiert und durchspannen in Verbindung mit DotC, DotD und DotH die innere und äußere Membran sowie das Periplasma. Wobei DotG für den Energietransfer von der inneren Membran zuständig sein könnte (Luo and Isberg, 2004). Der zweite Subkomplex besteht aus den Proteinen DotL, DotM und DotN sowie IcmS und IcmW und ist für die Initiation der Translokation zuständig. Dabei bilden DotL, DotM und DotN einen Komplex an der inneren Membran, der die Effektoren in den Kanal des T4BSS digeriert und energetisiert gleichzeitig den Transport durch ATP Hydrolyse (Sexton *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2006). Der Transport der Effektorproteine wird durch die Interaktion mit den cytoplasmatischen

Chaperonen IcmS und IcmW vermittelt (Ninio *et al.*, 2005; Bardill *et al.*, 2005; Cambronne and Roy, 2007). Außerdem wird davon ausgegangen, dass die Chaperone IcmS und IcmW die Effektoren direkt an den DotL/DotM/DotN Komplex übergeben (Vincent *et al.*, 2006; Vincent *et al.*, 2012; Sutherland *et al.*, 2012). Ein weiteres Protein des T4BSS ist DotA, es ist an der inneren Membran assoziiert und notwendig für die intrazelluläre Replikation von *Legionella* (Roy *et al.*, 1998). Aus diesem Grund werden die nicht virulenten $\Delta dotA$ Mutanten zu *L. pneumophila* Pathogenitätsstudien eingesetzt. Es wurden ca. 300 Effektorproteine, die mit T4BSS in die Wirtszelle transloziert werden, identifiziert (Xu and Luo, 2013; Isaac and Isberg, 2014). Diese Dot/Icm Effektorproteine sind notwendig für die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila*, die Etablierung der *Legionella*-containing vacuole (LCV), die Inhibition der Wirtszellapoptose sowie für die Aufnahme und das Verlassen der Wirtszelle. Einige dieser Effektorproteine werden in Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

Siderophore

Eisen ist nicht nur eine entscheidende Komponente für das Wachstum von *L. pneumophila*, sondern auch die Eisenakquisition ist von zentraler Bedeutung für Virulenz. So ist die intrazelluläre Replikation in humanen Makrophagen durch eisenlimitierende Bedingungen beeinträchtigt (Reeves *et al.*, 1981; Byrd and Horwitz, 2000; Viswanathan *et al.*, 2002). Aus diesem Grund nutzt *L. pneumophila* mehrere Mechanismen, um Eisen aus der Umwelt oder von der Wirtszelle zu rekrutieren. Hierfür sezerniert *L. pneumophila* unter anderem das Siderophor Legiobactin, welches Eisen (III) im extrazellulären Milieu bindet. Jedoch gehört das Legiobactin nicht zu den klassischen Catecholaten oder Hydroxamaten, sondern weist eine neue Struktur auf (Liles *et al.*, 2000; Cianciotto, 2007). Die Legiobactin Expression ist abhängig von den Genen *lbtA/B*, wobei es sich bei *LbtA* um eine Siderophor-Synthetase handelt und *LbtB* vermutlich den Export von Legiobactin über die innere Membran in Periplasma vermittelt (Allard *et al.*, 2006). Die Aufnahme des Legiobactins in die Zelle erfolgt anschließend durch den Rezeptor *LbtU*. Wobei es sich hier um einen neuen, TonB unabhängigen Rezeptortyp, zu handeln scheint (Chatfield *et al.*, 2011).

Die weitere Eisenaufnahme erfolgt über den GTP-abhängigen Eisentransporter *FeoB*. Das Transmembranprotein transportiert Eisen(II) über die innere Membran. Eine Mutation von *FeoB* führt zu einer reduzierten intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* in Makrophagen und Amöben (Robey and Cianciotto, 2002; Petermann *et al.*, 2010). Darüber hinaus verfügt das *L. pneumophila* Pigment Pyomelanin über eine Eisen-reduktase-Aktivität und vermittelt durch die Reduktion von Eisen (III) zu Eisen (II)

wahrscheinlich einen zusätzlichen Weg zur Eisenaufnahme über FeoB (Chatfield and Cianciotto, 2007).

Eukaryoten ähnliche Proteine

L. pneumophila zählt zu den Bakterien mit der höchsten Anzahl an Genen, welche für Eukaryoten-ähnliche Proteine oder Motive kodieren. Die Eukaryoten-ähnlichen Proteine sind potenzielle Virulenzfaktoren und dienen der Wirtszellmodulation, um das Überleben und die Replikation von *L. pneumophila* zu begünstigen (Cazalet *et al.*, 2004). Eine Vielzahl dieser Proteinmotive umfasst spezifische enzymatische Aktivitäten oder Protein-Interaktionsdomänen. Diese vermitteln innerhalb der Wirtszelle in erste Linie posttranslationale Modifikationen, wie Methylierungen, Ubiquitinierungen oder Phosphorylierungen. Ein Großteil dieser Proteine sind Effektoren des Typ IV Dot/Icm Sekretionssystems. So konnte gezeigt werden, dass der Effektor LegAS4/RomA mittels einer eukaryotischen SET Domäne das Wirtszell-Chromatin methyliert. Durch diese Histonmodifikation wird die Immunantwort der Zelle reprimiert (Rolando *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013).

Proteine, die an posttranslationalen Ubiquitinierungen beteiligt sind, zeigen Homologien zu funktionellen eukaryotischen Proteinmotiven, wie zum Beispiel F-Box und U-Box Domänen. Diese F- und U-Box Proteine sind Teil der eukaryotische Ubiquitinierungs-Maschinerie. So verursachen die Eukaryoten-ähnlichen Dot/Icm abhängigen Effektor-Proteine, dass die LCV während der Infektion von polyubiquitinierten Proteinen umgeben ist und Wirtspoteine gezielt abgebaut werden (Ivanov and Roy, 2009). Das *L. pneumophila* Dot/Icm Effektorprotein LubX verfügt über eine E3-Ubiquitinligaseaktivität und moduliert dadurch den kontrollierten Abbau des Effektorproteins SidH durch das Wirtszellproteasom. Dies verhindert unter anderem eine zytotoxische Wirkung von *Legionella* Effektoren auf die Wirtszelle (Kubori *et al.*, 2008; Kubori *et al.*, 2010; Hubber *et al.*, 2013). Das Effektorprotein AnkB verfügt zusätzlich noch über zwei Ankyrin-Repeats und ein C-terminales CAAX-Motiv. AnkB vermittelt die Polyubiquitinierung von Protein an der LCV und ist essentiell für die intrazelluläre Replikation in Makophagen und Amöben. Es wird davon ausgegangen, dass die Proteindegradation durch das Proteasom Aminosäuren für die Replikation von *L. pneumophila* bereit stellt (Al-Khodori *et al.*, 2008; Price *et al.*, 2009; Price *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2011). Die Proteine der SidE Effektorfamilie ubiquitinieren zahlreiche Rab GTPasen des ERs und tragen somit zur Reifung der LCV bei. Dabei erfolgt die Reaktion unabhängig von E1, E2 oder E3 Ligasen (Qiu *et al.*, 2016).

Protein Phosphorylierungen sind von zentraler Bedeutung in der Signaltransduktion von eukaryotischen Zellen. In *L. pneumophila* wurden vier Eukaryoten-ähnliche Serin/Threonin Kinasen identifiziert, LegK1-LegK4 (Cazalet *et al.*, 2004; de Felipe *et al.*, 2005; D'Auria *et*

al., 2010; Schroeder *et al.*, 2010; Flayhan *et al.*, 2015). So ist LegK2 durch die Inhibition der Aktin Polymerisierung an der Rekrutierung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) an die LCV beteiligt, sowie an der Prävention der phagolysosomalen Fusion (Hervet *et al.*, 2011; Michard *et al.*, 2015).

Der genaue Mechanismus, mit dem *L. pneumophila* diese eukaryotischen Sequenzen akquiriert und in das eigene Genom integriert, ist noch nicht bekannt. Jedoch wird davon ausgegangen, dass diese Sequenzen mit Translokationssignalen fusionieren und sich dadurch Typ IV Effektoren entwickeln (Degtyar *et al.*, 2009).

Biphasischer Lebenszyklus von L. pneumophila

L. pneumophila weist einen biphasischen Lebenszyklus auf. Die ist eine Adaptation an die wechselnden Anforderungen von extrazellulärem Überleben und intrazellulärem Wachstum. Aus diesem Grund ist *L. pneumophila* in zwei verschiedenen morphologischen und physiologischen Differenzierungszuständen zu finden, der replikativen und der transmissiven Phase. Diese Phasen können von der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase abgeleitet werden (Rowbotham, 1980; Molofsky and Swanson, 2004). Diese phänotypische Anpassung erfordert eine komplexe und zeitlich koordinierte Regulation der Genexpression. So werden während des exponentiellen Wachstums in der replikativen Phase vor allem Gene des Kohlenhydrat- und Aminosäure Stoffwechsels exprimiert, welche die Vermehrung von *L. pneumophila* intrazellulär, in der LCV, begünstigen. Hingegen zeichnet sich die transmissive Phase durch die Expression von Dot/Icm Substraten, Komponenten der Flagellenbiosynthese und anderen Virulenzfaktoren, sowie der Repression der Replikation aus (Brüggemann *et al.*, 2006). In der stationären Phase kommt es aufgrund der nährstoffarmen Bedingungen zur Aktivierung der ppGpp Synthesen RelA und SpoT (Zusman *et al.*, 2002; Dalebroux *et al.*, 2009). RelA ist ein an die Ribosomen assoziiertes Protein und wird durch nicht beladene tRNAs an den Ribosomen aktiviert. Hingegen wird die Aktivität von SpoT durch die Fettsäure Biosynthese bzw. die Konzentration von kurzen Fettsäureketten reguliert (Wendrich *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2009). Die Akkumulation von ppGpp koordiniert nun den Eintritt in die transmissive Phase durch den alternativen Sigmafaktor RpoS. RpoS reguliert unter anderem die Expression der Effektoren des Dot/Icm Sekretionssystems (Hovel-Miner *et al.*, 2009). Desweiteren reguliert das Ribosomen-bindungs-Protein DksA, ebenfalls in Abhängigkeit von ppGpp, des Expression des transmissiven Phänotyps von *L. pneumophila* (Dalebroux *et al.*, 2010). Ferner regulieren ppGpp und DksA die Aktivität des *filA* Promotors. Der Flagellen Sigmafaktor FilA ist notwendig für die Flagellenbiosynthese und trägt damit zur Motilität sowie Transmission von *L. pneumophila* bei (Heuner *et al.*, 2002; Dalebroux *et al.*, 2010). Auf postrationaler Ebene reguliert das

Zweikomponenten System LetA/S, aktiviert durch ppGpp, indirekt über das RNA-bindende Protein CsrA, die Differenzierung zur transmissiven Form (Hovel-Miner *et al.*, 2009; Sahr *et al.*, 2009; Nevo *et al.*, 2014).

Folglich tritt *L. pneumophila* mit zunehmender Zelldichte in der LCV und dem einhergehenden Nährstoffmangel in die transmissive Phase ein. Mit erworbener Motilität und der Expression von Virulenzfaktoren, kommt es zur Lyse der Wirtszelle, um eine Neuinfektion von Zielzellen zu ermöglichen. Damit ist der intrazelluläre Infektionszyklus von *L. pneumophila* bzw. die Biogenese der LCV auch vom Wachstumsphasen-orientierten Entwicklungsstadium der Bakterien abhängig (Molofsky and Swanson, 2004). Jedoch ist die Art der Differenzierung von *L. pneumophila* nicht nur abhängig von der Wachstumsphase, sondern auch von der vorangegangenen Wirtszelle. So konnte gezeigt werden, dass die Infektiosität der Bakterien nach einer Infektion von humanen Makrophagen im Vergleich zu einer Infektion von *Acanthamoebae castellanii* verringert ist (Abdelhady and Garduño, 2013).

3.1.3. Intrazellulärer Infektionszyklus von *L. pneumophila*

Die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* verläuft in alveolaren Makrophagen ähnlich ab wie bei freilebenden Protozoen. Dieser intrazelluläre Infektionszyklus ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Phagozytose

Adhäsion und Invasion in die Wirtszelle zählen zu den Ersten und zentralen Prozessen in der Infektion von *L. pneumophila*. Jedoch kommt entscheidend hinzu, dass *L. pneumophila* über eine Vielzahl an Wirtszellen verfügt und es ist unklar, ob diese Mechanismen spezifisch für verschiedene Wirtszellen sind. Desweiteren muss zwischen spezifischen Interaktionen mit den Zielzellen und einer unspezifischen Aufnahme von Amöben oder Makrophagen, als potentielle Beute oder Immunabwehr, unterschieden werden (Samrakandi *et al.*, 2002).

Für *L. pneumophila* sind zwei Formen der Phagozytose bekannt, zum einen die konventionelle Phagozytose und zum anderen die „coiling“ Phagozytose (siehe Abbildung 3.2). Die „coiling“ Phagozytose ist charakterisiert durch die Ausbildung eines Pseudopodiums des Phagozyten, durch welches das Bakterium umwickelt und anschließend internalisiert wird. Dieser seltene Vorgang konnte in Amöben und Makrophagen beobachtet werden (Horwitz, 1984; Bozue and Johnson, 1996). Jedoch konnte die Form der „coiling“ Phagozytose nicht für alle *L. pneumophila* Serotypen beobachtet werden, was auf einen, für *L. pneumophila*, eher unüblichen Phagozytose Mechanismus hinweist (Rechnitzer and Blom, 1989).

Ferner konnte gezeigt werden, dass in *D. discoideum* und Makrophagen die Aufnahme von *L. pneumophila* auch über Macropinocytose erfolgt (Watarai *et al.*, 2001; Peracino *et al.*, 2010). Macropinocytose beinhaltet die Auffaltung der Plasmamembran durch die Umlagerung von Aktinfilamenten und führt zur Internalisierung von großen Membranmengen sowie extrazellulärem Medium. So entsteht ein großes intrazelluläres Kompartiment, das Macropinosom (Johannes and Lamaze, 2002; de Carvalho *et al.*, 2015).

Neben der „coiling“ Phagozytose bei Makrophagen ist auch eine Opsonin-vermittelte Aufnahme möglich. Das Protein MOMP (major outer membrane protein) bindet den Komplementfaktor C3, was zur Komplement-bedingten Aufnahme von *L. pneumophila* in Makrophagen führt (Krinos *et al.* 1999). So kommt es durch Opsinisierung verstärkt zu einer konventionellen Phagozytose (Payne and Horwitz, 1987; Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990; Cirillo *et al.*, 1999). Jedoch sind Komplementrezeptor-Interaktionen am effizientesten, wenn es zusätzlich zu einer Fc Rezeptor-Bindung kommt. Diese Interaktionen wären denkbar über den MOMP-C3-Komplex und LPS Antikörperbindungen (Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990; Mintz *et al.*, 1992; Husmann and Johnson, 1992). Darüber hinaus werden noch andere Mechanismen zur Invasion *L. pneumophila* genutzt, so konnte nämlich eine opsinisierungsunabhängige Phagozytose durch Makrophagen beobachtet werden. Diese opsinisierungsunabhängige Phagozytose korreliert zudem mit einem erhöhten interzellulären Überleben sowie einer erhöhten Virulenz in Mäusen. Ferner invadiert *L. pneumophila* auch in Epithelzellen, welche über nur sehr wenige Fc Rezeptoren verfügen (Rodgers and Gibson, 1993; Gibson *et al.*, 1994; Cirillo *et al.*, 1999; Weissgerber *et al.*, 2003). Neben dem MOMP-Protein hat auch das Oberflächenprotein RtxA einen Einfluss auf die Adhärenz und Phagozytose durch die Wirtszelle (Cirillo *et al.*, 2001; D'Auria *et al.*, 2008). Für pathogene Bakterien konnte bereits gezeigt werden, dass Proteine der RTX Familie an β 2-Integrin Rezeptoren von humanen Neutrophilen und HL60 Zellen binden können. So könnte auch RtxA mit den β 2Integrin Untereinheiten von Komplementrezeptoren interagieren (Lally *et al.*, 1997; Morova *et al.*, 2008). Generell sind Aktin sowie das Aktin bindende Protein Coronin für eine erfolgreiche Internalisierung in *D. discoideum* erforderlich (Lu and Clarke, 2005).

Ein weiterer Faktor für einen erfolgreichen Eintritt in die Wirtszelle ist die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) durch *L. pneumophila*. Es konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* den Eintritt in Makrophagen sowie in *D. discoideum* durch Tyrosinphosphorylierungen von Proteinen induziert, welche PI3K aktivieren und zur Cytoplasmamembran rekrutieren. Die aktivierte PI3K führt anschließend zu Aktin-Polymerisierung und Phagozytose (Tachado *et al.*, 2008; Peracino *et al.*, 2010). Dennoch erfolgt die Phagozytose von *L. pneumophila* Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat

(PI(3,4,5)P₃) unabhängig. So wird zwar die Bildung von PI3K (PI(3,4,5)P₃) inhibiert, um die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu vermeiden, aber dennoch PI3K rekrutiert um die Phagozytose zu initiieren (Harada *et al.*, 2012).

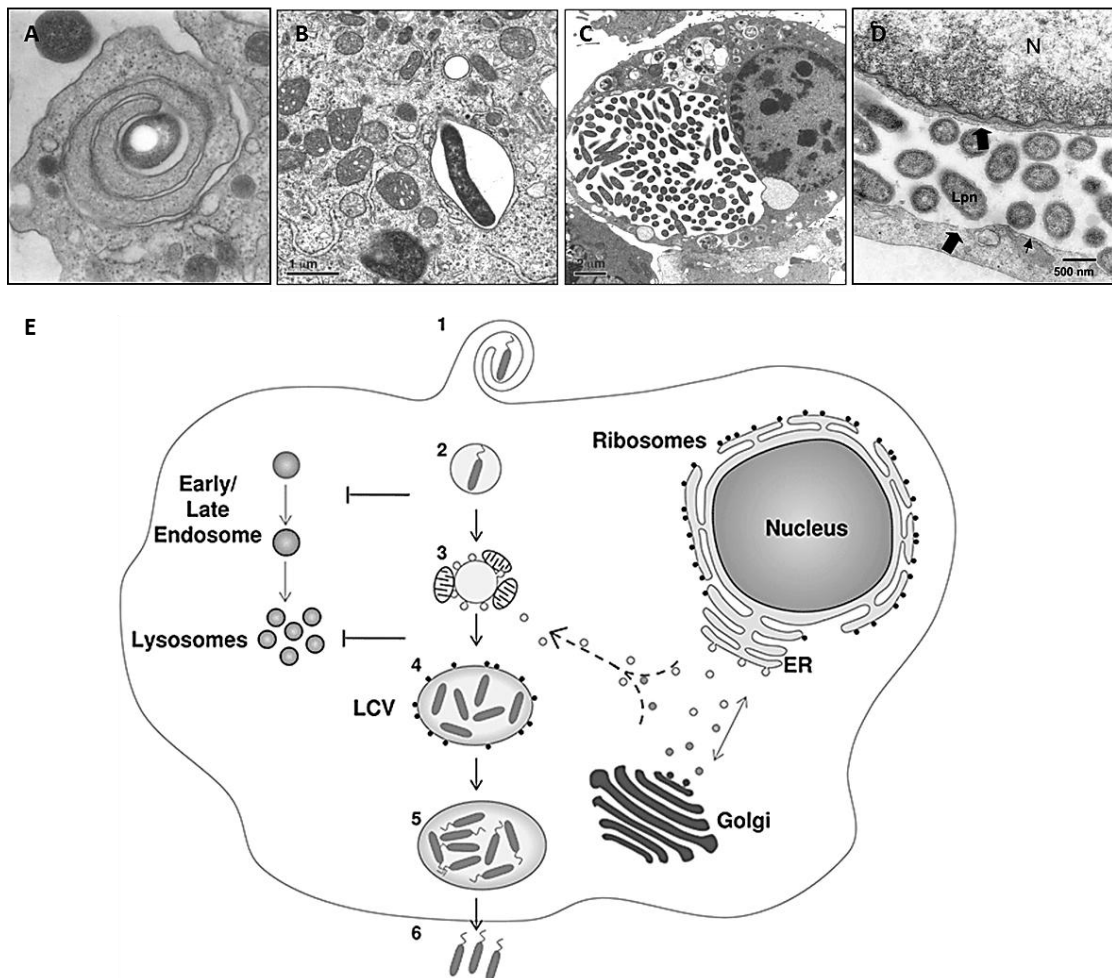


Abbildung 3.2: Intrazellulärer Infektionszyklus von *L. pneumophila*. (ABCD) Elektronenmikroskopische Darstellungen der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen. (A) Coiling Phagozytose von *L. pneumophila*. Bakterium im Inneren des Pseudopodiums (modifiziert nach Horwitz, 1984). (BC) LCV eines Makrophagen zu Beginn und Ende der intrazellulären Replikation (modifiziert nach Pearson *et al.*, 2015). (D) Zerstörte LCV Membran am Ende der Infektion (modifiziert nach Molmeret *et al.*, 2004). (E) Schematische Darstellung des intrazellulären Infektionszyklus von *L. pneumophila*. (1) Internalisierung der Bakterien durch die Wirtszelle durch Phagozytose bzw. coiling Phagozytose. (2) Nach dem Eintritt in die Wirtszelle wird die phagolysomale Fusion inhibiert. (3) In den ersten Stunden der Infektion assoziieren Mitochondrien an die LCV. Es kommt zur Fusion mit den sekretorischen Vesikeln des ER. (4) Ausbildung einer ER-ähnlichen Vakuole, umgeben von Ribosomen. (5) *Legionella* beginnt intrazellulär zu replizieren. (6) *L. pneumophila* verlässt die Wirtszelle. (Franco *et al.*, 2009)

Zusätzlich hat auch das Typ IV Sekretionssystem Dot/Icm einen Einfluss auf die Effizienz der Phagozytose. Dies demonstriert, dass *L. pneumophila* mithilfe von Dot/Icm Effektoren bereits zum Zeitpunkt der Adhäsion in die Signaltransduktion der Wirtszelle eingreift, um die gezielte Phagozytose zu induzieren (Hilbi *et al.*, 2001). Außerdem scheint der enge Kontakt zwischen Bakterium und Wirtszelle während der Phagozytose wichtig für die schnelle und effiziente Translokation von Effektor-Proteinen durch das Icm/Dot Sekretionssystem zu sein (Charpentier *et al.*, 2009).

Ausbildung der LCV (Legionella-containing vacuole)

Nach der Phagozytose befindet sich *L. pneumophila* in einem membranumschlossenen Phagosom (siehe Abbildung 3.2). In der ersten Phase der Infektion erfolgt die Ausbildung der LCV. Hierfür kommt es zunächst zur Assoziation von Mitochondrien und im Weiteren von Vesikeln des rauen endoplasmatischen Reticulums (ER) an die LCV (Derré and Isberg, 2004; Robinson and Roy, 2006). Nach der abgeschlossenen Ausbildung der LCV, ist diese vollständig umschlossen von Ribosomen, und *L. pneumophila* beginnt zu replizieren. Zentral in der Pathogenese von *L. pneumophila* ist die sofortige Entkopplung von der endosomalen Reifung des *Legionella*-haltigen Phagosoms, was in der Fusion mit endosomalen und lysosomalen Vesikeln resultieren würde. Dies hätte eine Ansäuerung des Phagosoms und den Abbau der Bakterien durch proteolytische Enzyme zur Folge. Dementsprechend weist die LCV keinerlei endozytische Marker auf, wie das Lysosom assoziierte Glykoprotein LAMP-1, die Protease Cathepsin D sowie die GTPase Rab 5 (Clemens *et al.*, 2000; Sturgill-Koszycki and Swanson, 2000). So nutzt *L. pneumophila* das Dot/Icm Sekretionssystem, um eine Vielzahl der zellulären Prozesse des Wirts zu manipulieren, zum einen, um den endolysosomalen Abbau zu vermeiden, und zum anderen, um eine permissive LCV zur intrazellulären Replikation zu etablieren und die Nährstoffressourcen der Wirtszelle zu akquirieren.

Zu den Dot/Icm Effektorproteinen für die Vermeidung der endolysosomalen Fusion gehört unter anderem LegG1. LegG1 fungiert als GEF (guanine nucleotide exchange factor), um die GTPase Ran zu aktivieren. Diese ist ein Regulator für den Vesikeltransport sowie die Strukturierung des Zytoskeletts. Auf diese Weise kann das RanGTP bindende Protein RanBP1 an die LCV rekrutiert werden, was die Migration der LCV entlang der Mikrotubuli zur Folge hat. Dieser Mechanismus könnte die Fusion mit endosomalen Vesikeln vermeiden (Stein *et al.*, 2012; Rothmeier *et al.*, 2013; Hilbi *et al.*, 2014; Simon *et al.*, 2014). Desweiteren verändert *L. pneumophila* die Komposition der Phosphatidylinositol (PIPs) Lipide in der Membran der LCV. So wird bereits zu Beginn der Infektion Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI(3)P) bis zu Phosphatidylinositol 4-Phosphat (PI(4)P) umgewandelt. Denn PI(3)P ist überwiegend auf Vesikeln des endolysosomalen Systems zu finden und dient der Verankerung von Proteinen für die endolysosomale Reifung des Phagosoms. PI(4)P hingegen kennzeichnet die Vesikel des Golgi Apparates (Behnia and Munro, 2005; Weber, Wagner, *et al.*, 2014). Diese Modifizierung wird durch die PI3-Phosphatasen SidF und SidP vermittelt (Hsu *et al.*, 2012; Toulabi *et al.*, 2013). Weitere Dot/Icm Effektorproteine für die Vermeidung der endolysosomalen Fusion sind außerdem VipA und VipD (Shohdy *et al.*, 2005). VipD wird von der GTPase Rab5 aktiviert und ist dann als Phospholipase ebenfalls an der Degradierung von PI3P beteiligt (Ku *et al.*, 2012; Gaspar and Machner, 2014; Lucas *et al.*, 2014). VipA hingegen bindet und polymerisiert Aktin. Es

assoziiert mit den frühen Endosomen und scheint somit deren Migration entlang der Aktin-filamente zu koordinieren (Franco *et al.*, 2012; Bugalhão *et al.*, 2016). Der Effektor SidK blockiert die Ansäuerung der LCV durch die Inhibition der ATP-Hydrolyse der H⁺-ATPase VatA (Xu *et al.*, 2010).

Neben der Vermeidung der endolysosomalen Degradation durch die Wirtszelle forciert *L. pneumophila* die Reifung der LCV zu einem ER-ähnlichen Kompartiment, welches die intrazelluläre Replikation initiiert (Horwitz, 1983b; Swanson and Isberg, 1995; Kagan and Roy, 2002). Wobei die LCV, aufgrund seines Proteoms, weiterhin als einzigartiges Kompartiment innerhalb der Wirtszelle zu betrachten ist (Urwyler *et al.*, 2009; Shevchuk *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2014; So *et al.*, 2015). Wichtige regulatorische Moleküle für den Vesikel- und Membran-Transport des Wirtes sind die GTPasen der ARF oder Rab-Familie. Diese Proteine sind inaktiv in ihrer cytosolischen GDP-gebundenen Form und assoziieren an Membranen, wenn sie durch GTP aktiviert werden (Hubber and Roy, 2010). *L. pneumophila* Dot/Icm Effektor Proteine greifen in die Signalwege dieser GTPasen ein und modulieren so den Vesikeltransport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat (siehe Abbildung 3.2).

SidM/DrrA ist ein multifunktionales Effektorprotein, es bindet nach der Translokation über PI(4)P an die LCV Membran (Brombacher *et al.*, 2009). Hier rekrutiert es die Rab1 GTPase zur LCV Membran und moduliert seine Aktivität. Rab1 ist notwendig für die Fusion von ER-Vesikeln mit dem Golgi-Apparat und eine Inhibierung ermöglicht in der *L. pneumophila* Infektion die Fusion von sekretorischen ER-Vesikeln mit der LCV und begünstigt somit die intrazelluläre Replikation (Kagan *et al.*, 2004; Ingmundson *et al.*, 2007). Dabei bindet SidM/DrrA spezifisch GDP gebundenes cytosolisches Rab1 und fungiert als GEF, um aktiviertes Rab1-GTP an die LCV-Membran zu assoziieren (Machner and Isberg, 2006; Murata *et al.*, 2006). Zusätzlich stabilisiert das Effektorprotein LidA aktiviertes Rab1-GTP, indem es GAP (GTPase activating protein) Bindung verhindert und fördert so die Rab1 abhängige ER Rekrutierung (Derré and Isberg, 2005; Machner and Isberg, 2006; Chen and Machner, 2013).

Darüber hinaus inaktiviert LepB durch seine GAP-Aktivität Rab 1. Dies geschieht vermutlich, um Rab 1 von Vesikeln, die bereits mit der LCV fusioniert sind, zu entfernen (Ingmundson *et al.*, 2007). Eine gegensätzliche Regulation bewirkt AnkX, es phosphochinoliert Rab1-GDP, sodass inaktives Rab1 an der Membran verbleibt (Tan *et al.*, 2011; Goody *et al.*, 2012). Das Effektorprotein RalF rekrutiert die GTPase Arf1. Dieses wird durch die Lokalisation an der LCV-Membran aktiviert und kann anschließend über die Sec7 Domäne mit Arf1 interagieren (Nagai *et al.*, 2002; Alix *et al.*, 2012). Arf1 (ADP ribosylation factor-1) ist ein wichtiger Regulator im Vesikeltransport zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat (Robinson and Roy, 2006). Die Assoziation von Arf1 an die LCV bedarf jedoch der

Aktivität von SidC und SdcA, welche über PI(4)P verankert sind. SidC und SdcA sind E3 Ubiquitinligasen und tragen so zur Akquisition des ER an die LCV bei (Weber *et al.*, 2006; Ragaz *et al.*, 2008; Horenkamp *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2014; Wasilko and Mao, 2016). Die rekrutierten ER Vesikel fusionieren dann mit der LCV Membran durch die Interaktion des vSNAREs Sec22b auf der Vesikelseite mit dem tSNARE Syntaxin3 auf der LCV Seite. Die Bindung von Syntaxin erfolgt hierbei über SidM/DrrA. Es ist jedoch auch möglich, dass *L. pneumophila* über eigene SNARE Proteine verfügt, wie den Effektor LseA (Arasaki *et al.*, 2012; King *et al.*, 2015).

Zusätzlich zur Reifung der LCV ist für die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* die Versorgung mit Nährstoffen essentiell. So nutzt *L. pneumophila* intrazellulär bevorzugt Aminosäuren als Energie sowie C-Quelle, welche hauptsächlich von der Wirtszelle bezogen werden (Schunder *et al.*, 2014). Ausreichende Mengen an freien Aminosäuren werden hierzu durch die Beeinflussung des Ubiquitin-Proteasoms generiert. So sorgt der Effektor AnkB durch seine F-Box Domäne, welche homolog zu der SKP1-Cullin-F-Box Domäne des eukaryotischen E3 Ubiquitin-Ligase Komplexes ist, zur Polyubiquitinierung zahlreicher Wirtsproteine an der LCV. Die durch Polyubiquitinketten markierten Proteine werden durch das Proteasom degradiert und anschließend durch weitere Wirtspeptidasen zu freien Aminosäuren abgebaut (Eylert *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2011). Desweiteren gehört Eisen zu den essenziellen Nährstoffen von *L. pneumophila*. Der Effektor IroT ist wichtig für die intrazelluläre Eisenaufnahme und Akquise und somit essentiell für intrazelluläre Replikation (O'Connor *et al.*, 2011; Portier *et al.*, 2015). Die Aufnahme von Eisen scheint zusätzlich durch die Phytat-Phosphatase LppA beeinflusst zu werden (Weber, Stirnimann, *et al.*, 2014).

Neben der Etablierung einer Replikations-permissiven LCV und dem Umgehen der endolysosomalen Fusion vermeiden zusätzliche Dot/Icm Effektoren das Absterben der Wirtszellen und stabilisieren die Integrität der LCV. So tragen die Effektoren LidA und WipB zur Stabilisierung der LCV bei (O'Connor *et al.*, 2012). SdhA hingegen reguliert die Phospholipase PlaA, um die Integrität der LCV Membran zu gewährleisten (Creasey and Isberg, 2012; Ge *et al.*, 2012). Die Effektoren LegK1 und LnaB aktivieren dagegen den NH- κ B Signalweg und verhindern somit die Apoptose der Wirtszelle (Ge *et al.*, 2009; Losick *et al.*, 2010). SidF inhibiert die mitochondrialen proapoptotische Proteine, BNIP3 und Bcl-rambo. BNIP3 und Bcl-rambo gehören zu der Bcl2-Familie (Laguna *et al.*, 2006; Banga *et al.*, 2007).

Mechanismen zum Verlassen der Wirtszelle

Der letzte Schritt im intrazellulären Infektionszyklus ist das Verlassen bzw. die Lyse der Wirtszelle, um die Transmission zu neuen Zielzellen zu ermöglichen. So ist *L. pneumophila*

in den späten Stadien der Infektion von *D. discoideum* und Makrophagen frei im Zytoplasma zu finden. Die Fähigkeit die LCV zu verlassen, scheint dabei durch Porenbildung und Membranlyse vermittelt zu sein (Alli *et al.*, 2000; Molmeret *et al.*, 2004). Ferner reguliert die Lyse der LCV und die letzte Replikation im Zytoplasma der Wirtszelle die Expression von transmissiven Virulenzfaktoren, wie die Flagelle (Molmeret *et al.*, 2010). Im weiteren Verlauf wird durch erneute Porenbildung die strukturelle Integrität von cytoplasmatischen Organellen sowie der Plasmamembran zerstört und die Wirtszelle lysiert (siehe Abbildung 3.2) (Molmeret and Abu Kwaik, 2002). Dabei ist das IcmT Protein essentiell für die Porenbildung in Protozoen und Makrophagen, wobei die C-terminal Domäne von IcmT essentiell für porenbildende Aktivität ist (Molmeret *et al.*, 2002; Molmeret *et al.*, 2002). *L. pneumophila* verfügt zudem über weitere lytische Komponenten, wie Legiolysin, ProA, oder T1SS und T2SS sezernierte Phospholipasen (Keen and Hoffman, 1989; Wintermeyer *et al.*, 1994; Bender *et al.*, 2009; Aurass *et al.*, 2013). *L. pneumophila* kann die Wirtszelle aber auch durch eine Apoptoseinduktion über den Caspase 3-Signalweg verlassen. Die Caspase 3-abhängige Apoptose kann wahrscheinlich von 5 Dot/Icm Effektoren ausgelöst werden. Dazu gehört unter anderem die Phospholipase VipD, durch die Hydrolyse zur Destabilisierung der mitochondrialen Membran beitragen kann. Die resultierende Freisetzung von Cytochrom C würde zur Aktivierung von Caspase 3 führen (Müller *et al.*, 1996; Gao and Abu Kwaik, 1999; Zhu *et al.*, 2013). In Makrophagen scheint die Porenbildung darüber hinaus durch den Nod-like Rezeptor (NLR) Nlrc4 und das Caspase 1 Inflammasom der Wirtszelle zu erfolgen, hierbei wird Nlrc4 durch das Flagellin von *L. pneumophila* in der transmissiven Phase aktiviert (Silveira and Zamboni, 2010). In Protozoen scheint die Entlassung der Bakterien zusätzlich auf einem nicht lytischen Weg möglich. Die SNARE ähnlichen Effektorproteine LepA und LepB vermitteln dazu die Fusion zwischen der LCV und Cytoplasmamembran (Chen *et al.*, 2004).

3.1.4. *L. pneumophila* Mutanten mit Defekten in der Inhibition der phagolysosomalen Fusion

Zur weiteren Erforschung der durch *L. pneumophila* genutzten Mechanismen zur intrazellulären Replikation wurde in vorangegangenen Arbeiten eine *L. pneumophila* Transposonbibliothek generiert. Mit deren Hilfe im Speziellen Klone mit Defekten in der Inhibition der phagolysosomalen Fusion identifiziert und selektiert werden konnten, welche unabhängig von Dot/Icm Effektoren sind. Hierzu wurde der *L. pneumophila* Corby Stamm mit dem mini-Tn10 Transposon mutagenisiert (Pope *et al.*, 1994).

Die erhaltenen Klone wurden anschließend bezüglich ihrer Fähigkeit die phagolysosomale Fusion zu inhibieren, mit der Magnetic Separation Technology (MST) Methode selektiert

(Shevchuk and Steinert, 2009). Dazu wurde *D. discoideum* mit den *L. pneumophila* Transposonmutanten infiziert und im Folgenden Eisendextranpartikeln zugesetzt, welche sich in dem lysosomalen Kompartiment anreichern. In einem weiteren Schritt wurde das Wirtszelllys auf magnetischen Säulen (MiniMACS) fraktioniert, sodass die Fraktionen der Transposonmutanten-enthaltenden phagolysosomalen Vakuolen von der Durchflussfraktion mit den Phagosomen, Mitochondrien, Zellkernen und andere Organellen getrennt und angereichert werden konnten (siehe Abbildung 3.3).

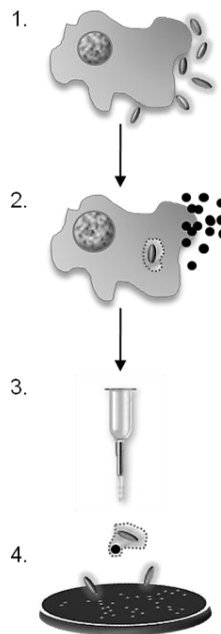


Abbildung 3.3: Mechanisches Screening der *L. pneumophila*-Transposonmutanten mit Defekten in der Inhibition der phagolysosomalen Fusion. *D. discoideum* wird mit *L. pneumophila* mini-Tn10 Transposonmutanten infiziert und mit Eisen-Dextran inkubiert, welches im Lysosom eingelagert wird. Durch Lyse der Zellen, werden die Mutanten nach der phagolysosomalen Fusion mit Hilfe der MiniMAC Säulen selektiert und auf BCYE-Agar kultiviert. (modifiziert nach Shevchuk *et al.*, 2014).

Die Insertionsposition des mini-Tn10 Transposons wurde anschließend mittels Singleprime PCR oder Southern Blot und den Programmen InFire sowie NCBI BLAST® bestimmt (Karlyshev *et al.*, 2000; Shevchuk *et al.*, 2012). Insgesamt wurden so 54 *L. pneumophila* mini-Tn10 Mutanten mit Defekten in der Inhibition der phagolysosomalen Fusion selektiert. Von diesen Mutanten wurden mehrere Transposoninsertionen in dem Gen *pilY1* identifiziert, welches mit der Typ IV Pili Biogenese assoziiert ist (Shevchuk *et al.*, 2014). *pilY1* Transposonmutanten zeigten Phänotypen in *D. discoideum* Plaqueassays sowie Replikationsassays in *D. discoideum* und U937 Makrophagen. Desweiteren konnte *pilY1* nur in pathogen *L. pneumophila* Spezies identifiziert werden (Julia Hoppe, 2011; Shevchuk *et al.*, 2014).

3.2. Typ IV Pili

Typ IV Pili gehören zu den am weitesten verbreiteten bakteriellen Filamenten und stellen multifunktionelle Oberflächenstrukturen dar. Typ IV Pili sind überwiegend in Gram

negativen Bakterien zu finden, darunter fallen viele pathogene Spezies wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*, *Escherischia coli*, *Vibrio cholerae* sowie *Salmonella typhi* und *Francisella tualensis* (Girón *et al.*, 1991; Koga *et al.*, 1993; Lauer *et al.*, 1993; Aho *et al.*, 1997; Fullner and Mekalanos, 1999; Townsend *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2004). Dennoch haben Typ IV Pili einen früheren evolutionären Ursprung, da sie auch in Gram-positiven Bakterien sowie in Archea identifiziert werden konnten (Peabody *et al.*, 2003; Imam *et al.*, 2011; Pohlschroder *et al.*, 2011). So sind Typ IV Pili innerhalb der Gram-positiven Gattungen hauptsächlich in *Clostridium* Spezies zu finden (Nölling *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2006). Im Folgenden soll jedoch nur auf die Typ IV Pili Gram negativer Bakterien eingegangen werden.

3.2.1. Typ IV Pili in Gram-negativen Bakterien

Typ IV Pili sind flexible, dünne Filamente mit einem ungefähren Durchmesser von 6-9 nm und bis zu einigen μm Länge. An der bakteriellen Oberfläche liegen sie entweder als einzelne Filamente vor oder bilden Bündel (siehe Abbildung 3.4). Darüber hinaus verfügen Typ IV Pili über eine große mechanische Stabilität und können Kräfte bis 100 pN, oder bis zu mehreren nN als Bündel, aushalten. So kann sich die Piluskonformation unter Zugkraft zu einer 40 % schmaleren, ausgestreckten Form verändern, was den Vergleich der Pilus-Beschaffenheit mit einer Sprungfeder zulässt (Maier *et al.*, 2002; Biais *et al.*, 2008; Beaussart *et al.*, 2014). Typ IV Pili vermitteln eine Vielzahl von Funktionen, dazu gehören zum Beispiel die Adhäsion an Wirtszellen und Oberflächen, die Bildung von Aggregaten oder Mikrokolonien sowie die Biofilm Bildung, DNA-Aufnahme und die Absorption von Bakteriophagen und Motilität (Thanassi *et al.*, 2012; Giltner *et al.*, 2012; Berry and Pelicic, 2015).

Generell können Typ IV Pili hinsichtlich der Struktur der Pilin-Untereinheiten sowie anhand der Organisation der Pilusgene, in zwei Subgruppen unterteilt werden. So gehören die Pili von *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* zu der Typ IVa Gruppe und die bündelförmigen Pili von enteropathogenen *E. coli* sowie die Toxin koregulierten Pili von *V. cholerae* zu den Typ IVb Pili (Pelicic, 2008). Typ IVa und IVb Pili weisen keine großen strukturellen Unterschiede aus. Jedoch bilden die Typ IVa Pili aufgrund der Anordnung der Pilin-Untereinheiten eine rechtsdrehende Helix und die Typ IVb Pili eine linksdrehende Helix aus (Campos *et al.*, 2011). Der Aufbau und die Biogenese von Typ IV Pili sind sehr konserviert zwischen divergenten Spezies.

Aufbau

Typ IV Pili sind Polymere, welche sich überwiegend aus einer einzelnen 15-20 kDa großen Pilin Untereinheit zusammensetzen. Die Struktur der Typ IV Piline weist eine löffel- oder pfannenartige Form auf. Allen Pilin-Untereinheiten gemeinsam ist die konservierte

Proteinstruktur, bestehend aus einer globulären Domäne am C-Terminus und einer 25 Aminosäuren langen N-terminalen α -Helix. Basierend auf den Strukturmodellen vermittelt die N-terminale α -Helix aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften die Assoziation der einzelnen Pilin-Untereinheiten im Inneren des Filaments, während sich die Kopfdomänen an der Oberfläche des Pilus befinden. Dieser hydrophobe Kern, jeweils bestehend aus drei Helixbündeln, verschafft dem Typ IV Pilus die Flexibilität sowie die große strukturelle Festigkeit. Die globuläre C-terminale Domäne besteht aus dem α 1-C Abschnitt der N-terminalen α -Helix sowie 4 antiparallelen β -Faltblättern. Der Übergang zwischen der α -Helix und den β -Faltblättern wird als $\alpha\beta$ -Loop bezeichnet, ihm gegenüber liegt die sogenannte D-Region (Parge *et al.*, 1995; Craig *et al.*, 2003; Ramboarina *et al.*, 2005; Craig *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Craig and Li, 2008). Diese beiden Domänen vermitteln Wechselwirkungen zwischen den Kopfdomänen der einzelnen Pilin-Untereinheiten und stabilisieren den Pilus (siehe Abbildung 3.4). Darüber hinaus sind sie essentiell für die Protein-Interaktionen und damit die Funktion des Pilus. Ferner sind die Oberflächen dieser Domänen potentielle Antigene und werden durch posttranslationale Modifikationen und variable Aminosäuresequenzen entsprechend verschiedener Wachstumsphasen verändert (Craig *et al.*, 2004).

Charakteristisch für die Typ IV Pilin-Untereinheiten ist, dass sie als Vorläufer oder Prepiline mit einem konservierten, positiv geladenen, 10 Aminosäuren langen, Signalpeptid synthetisiert werden. Diese Signalpeptide werden während der Biogenese des Pilus von der Preplinpeptidase abgespalten. Die ersten 25 Aminosäuren des reifen Pilins stellen eine weitere hoch konservierte Region dar. Dieser hydrophobe Bereich ist notwendig für die Assemblierung der Pilin-Untereinheiten (Pasloske *et al.*, 1989; Strom and Lory, 1991; Macdonald *et al.*, 1993). Anhand der Länge des Signalpeptids sowie des Pilins, können Typ IV Prepiline in die IVa und IVb Subgruppen unterteilt werden. Typ IVa Piline verfügen über ein kurzes Signalpeptid mit weniger als 10 Aminosäuren und über eine Pilin-Untereinheit mit einer Länge von 150-160 Resten. Dagegen haben Typ IVb Piline ein 15-30 Aminosäuren langes Signalpeptid und die Pilin-Untereinheit ist entweder zwischen 180-200 Resten oder 40-50 Resten lang (Strom and Lory, 1991; Pelicic, 2008).

Neben der zentralen Pilin-Untereinheit umfassen die Typ IV Pilus Systeme noch weitere Prepilin-ähnliche oder Pseudopiline. Diese verfügen ebenfalls über ein N-terminales Signalpeptid und werden von der Preplinpeptidase prozessiert, sodass diese während der Biogenese in den Pilus integriert werden können (2002; Giltner *et al.*, 2010; Cisneros, Bond, *et al.*, 2012; Cisneros, Pehau-Arnaudet, *et al.*, 2012). Pseudopiline sind zum Teil notwendig für die Pilus-Biogenese oder modifizieren die Pilusfunktionen hinsichtlich Aggregation, DNA Aufnahme oder Adhäsion und Signaltransduktion (Winther-Larsen *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2002; Hélaine *et al.*, 2005; Winther-Larsen *et al.*, 2005; Mikaty *et al.*,

2009). Einige Typ IV Pili verfügen darüber hinaus noch über an den Pilus assoziierte Proteine welche unter anderem als Adhäsine fungieren können (Rudel *et al.*, 1995; Scheuerpflug *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2015).

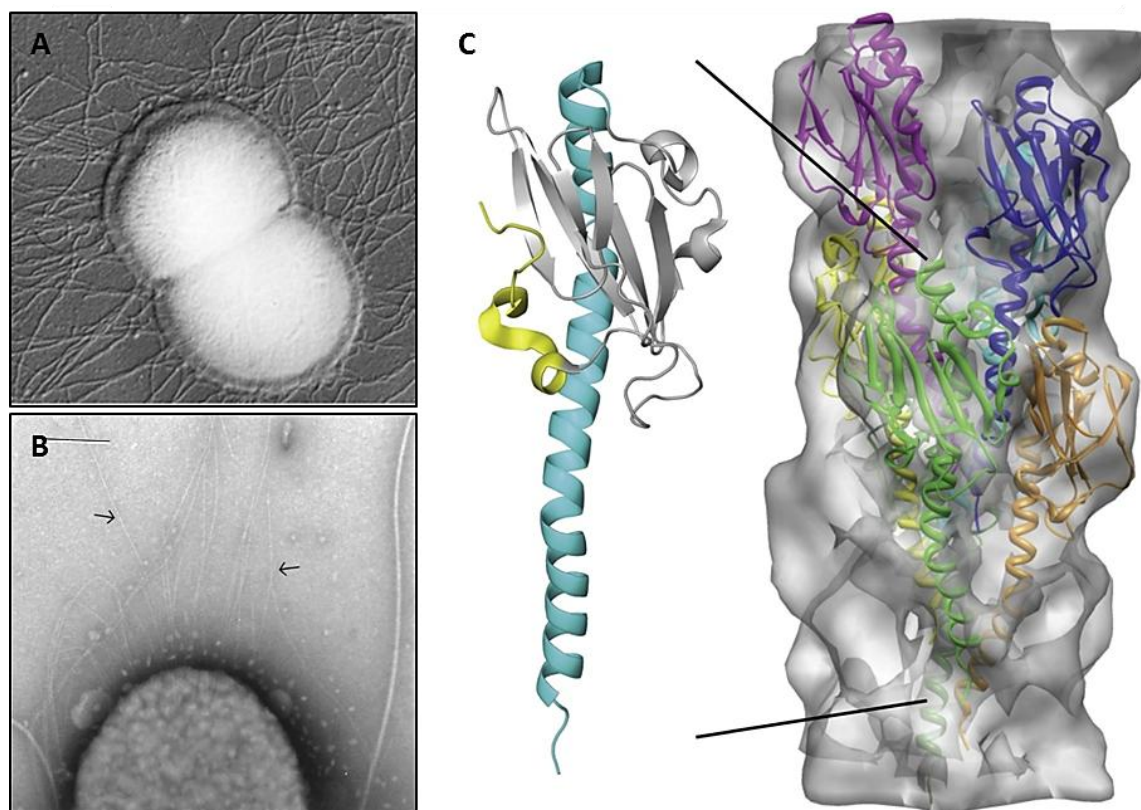


Abbildung 3.4: Struktur der Typ IV Pili sowie Pilin Untereinheiten. Elektronenmikroskopische Aufnahme der Typ IV Pilusfilamente an der Zelloberfläche von *N. gonorrhoeae* (A) und *P. aeruginosa* (B) (Déziel *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2004). (C) Elektronenmikroskopische Karte eines Typ IV Pilus von *N. gonorrhoeae*. Die entsprechenden Proteinstrukturen der Pilin Untereinheiten wurden in die Elektronendichte hinein modelliert. In der Mitte ist die Struktur des Pilinmonomers vergrößert und zeigt die globuläre Kopfdomäne (grau) sowie die hydrophobe N-terminale Helix (cyanblau) und die D-Region (gelb) (modifiziert nach Bergeron und Sgourakis, 2015).

Biogenese

Die Biogenese von Typ IV Pili erfordert ungefähr 15 verschiedene Gene. Diese Gene befinden sich innerhalb des Genoms an verschiedenen Positionen, sind jedoch in konservierten Clustern angeordnet, wie zum Beispiel die *pil* Gene von *P. aeruginosa* oder pathogenen *Neisseria* spp. (Lauer *et al.*, 1993; Mattick *et al.*, 1996; Aho *et al.*, 1997). Die zentralen Komponenten und Mechanismen der Pilus-Biogenese haben zudem Homologien zu Typ II Sekretionssystemen und sind konserviert zwischen den Typ IV Pili produzierenden Bakterien. Dennoch sind die molekularen Details der Typ IV Pilus Biogenese noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Ablauf der Pilus-Synthese soll hier anhand des Beispiel und der Nomenklatur von *P. aeruginosa* dargestellt werden (siehe Abbildung 3.5).

Der Typ IV Pilus-Syntheseapparat kann in vier unabhängige Subkomplexe unterteilt werden, welche die innere und äußere Membran sowie das Periplasma durchspannen.

Den dynamischsten Subkomplex stellt der Pilus selbst dar. Die zentrale Untereinheit ist hier das Pilin PilA, aber auch die Pilin-ähnlichen Proteine FimU, PilVWX und PilE können in das Filament integriert werden (Paranchych *et al.*, 1979; Alm and Mattick, 1996; Alm *et al.*, 1996; Winther-Larsen *et al.*, 2005; Giltner *et al.*, 2010). Prepilin-Untereinheiten werden wahrscheinlich kotranslational durch den Sec-Apparat in die innere Membran inseriert (Francetic *et al.* 2007). Dabei verbleiben die Prepilin-Untereinheiten als bitopische Proteine mit der hydrophoben N-terminalen α -Helix in der inneren Membran, während sich die C-terminale Kopfdomäne im Periplasma befindet und das Signalpeptid in das Cytoplasma ragt (Strom and Lory, 1987; Craig *et al.*, 2006; Arts *et al.*, 2007; Francetic *et al.*, 2007). Anschließend wird das Signalpeptid durch die Membran gebundene Prepilinpeptidase PilD abgespalten und das reife Pilin N-terminal methyliert (Nunn and Lory, 1991; Strom *et al.*, 1993).

Die Peptidase PilD gehört bereits zum Motor Subkomplex. Dieser umfasst darüber hinaus die Proteine PilB, PilU und PilT, welche Homologien zu den cytoplasmatischen Traffic ATPasen haben, sowie das Membranprotein PilC. PilB liegt als Hexamer vor und energetisiert durch ATP Hydrolyse die Assemblierung des Pilus. Die ATPasen PilU und PilT sind an der Depolymerisierung des Pilus beteiligt. PilC verfügt neben einer Membrandomäne auch über eine große cytoplasmatische Domäne und ist an der Polymerisierung sowie an der Depolymerisierung beteiligt (Planet *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2005; Chiang *et al.*, 2008; Misic *et al.*, 2010; Takhar *et al.*, 2013). Auf welche Weise die Energie zur Pilus-Synthese auf die Pilin-Untereinheiten übertragen wird, ist weiterhin unklar, da die Piline nach der Abspaltung des Signalpeptids in der inneren Membran verbleiben und die eigentliche Biogenese im Periplasma stattfindet (Lemkul and Bevan, 2011). Hierzu bildet der Alignment Subkomplex, mit den Proteinen PilMNOP und FimV, eine Verbindung zwischen dem Motor Subkomplex an der inneren Membran und dem Subkomplex der äußeren Membran (Ayers *et al.*, 2009; Sampaleanu *et al.*, 2009; Tammam *et al.*, 2011; Takhar *et al.*, 2013; Tammam *et al.*, 2013; Leighton, Dayalani, *et al.*, 2015). Außerdem tragen PilMNOP zur Effizienz der Pilus-Synthese bei, da sie die PilA Untereinheiten in die räumliche Nähe des Motor Subkomplex dirigieren (Tammam *et al.*, 2013; Karuppiyah *et al.*, 2013; McCallum *et al.*, 2016). FimV hingegen verfügt über eine Peptidoglycan-Bindungsdomäne und ist daran beteiligt, die Zellwand zur Insertion des Pilus anzupassen (Semmler *et al.*, 2000). Ferner wird davon ausgegangen, dass die Pilin-ähnlichen Proteine FimU, PilVWX und PilE die Assemblierung der PilA Untereinheiten initiieren und dabei die Spitze des synthetisierten Pilus bilden (Nguyen *et al.*, 2015).

Den letzten Subkomplex bilden die Proteine PilQ und PilF in der äußeren Membran. PilQ bildet dazu aus 12 Monomeren eine Sekretionspore in der äußeren Membran, durch

dessen Kanal das Pilusfilament an die Zelloberfläche gelangt. Das Lipoprotein PilF ist notwendig für korrekte Oligomerisierung und Lokalisierung von PilQ (Wolfgang *et al.*, 2000; Koo *et al.*, 2008; Koo *et al.*, 2013).

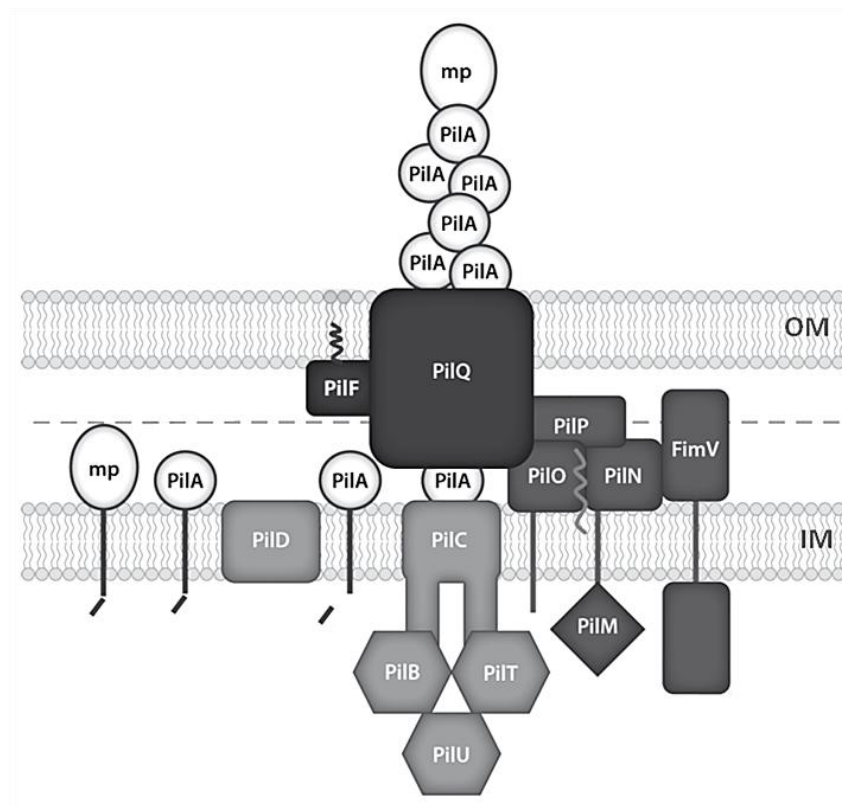


Abbildung 3.5: Modell zur Typ IV Pilus-Biogenesesystems von *P. aeruginosa*. Dargestellt sind die vier interagierenden Proteinsubkomplexe zur Biogenese des Typ IV Pilus. Der Pilus-Subkomplex mit der Pilin-Untereinheit PilA sowie den Pilin-ähnlichen Proteinen (mp) FimU, PilV, PilW, PilX und PilE. Diese werden von dem Alignment Subkomplex, bestehend aus den Proteinen PilM, PilN, PilO, PilP und FimV zum eigentlichen Filament assembliert. Der Vorgang wird durch den Motor Subkomplex der Proteine PilB, PilC, PilD, PilT und PilU, energetisiert. Der Pilus gelangt durch den Außenmembran Subkomplex an die Zelloberfläche. Hierzu bilden die Proteine PilQ und PilF eine Pore in der äußeren Membran (modifiziert nach Burrows, 2012).

3.2.2. Funktionen von Typ IV Pili in der Virulenz

Typ IV Pili fungieren ebenfalls als wichtige Virulenzfaktoren in vielen pathogenen Bakterien wie *P. aeruginosa*, *Neisseria* spp., *Vibrio cholerae*, sowie enterotoxischen *E. coli*. Hier erfüllen Typ IV Pili ein Kontinuum an Funktionen in der Interaktion zwischen Wirtszelle und Pathogen. Dies beinhaltet den ersten Zell-Zellkontakt oder die Adhäsion sowie Kolonisation und Modellierung der Wirtszelloberfläche, aber auch die Invasion in Wirtszellen oder Gewebe und die Verbreitung in neue Infektionsherde.

Eine der wichtigsten Funktionen von Typ IV Pili in der Pathogenität von Bakterien ist die Adhärenz an Wirtszellen sowie an Biofilme oder andere Oberflächen. In den meisten Fällen erfolgt die Adhäsion durch Interaktion der Pilin-Untereinheit. Hier stellen insbesondere die D- als auch die $\alpha\beta$ - Regionen der globulären Pilindomäne wichtige Oberflächen zur

Rezeptorbindung dar (Lee *et al.*, 1994; Scheuerpflug *et al.*, 1999). Für *P. aeruginosa* Typ IV Pili wird eine Bindung mittels der D-Region von PilA an die Disaccharide β -GalNAc(1-4) β Gal von den Glykolipiden asialo-GM1 und GM2 diskutiert (Lee *et al.*, 1994; Hazes *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2001; Suh *et al.*, 2001). Die Pilin-Untereinheit PilE von *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* vermittelt eine Adhäsion an die Rezeptoren von Endothelzellen. Hierzu zählen die Rezeptoren CD147 und der β 2-Adrenoceptor (β 2AR). CD147 gehört zu der Immunoglobulin (Ig) Superfamilie und vermittelt die erste Bindung des *N. meningitidis* Pilus an das zerebrale Endothel. An dieser Interaktion ist zusätzlich noch das Pilin-ähnliche Protein PilV beteiligt (Iacono *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2014; Bernard *et al.*, 2014). Der Rezeptor β 2AR gehört zu der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie und die Piline PilE und PilF können hierüber mit den Endothelzellen interagieren (Coureuil *et al.*, 2010). Desweiteren wird CD46 als Rezeptor für *Neisseria* Pili diskutiert, jedoch liegen hier konträre Ergebnisse vor (Källström *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 2003; Kirchner *et al.*, 2005; Weyand *et al.*, 2006; Weyand *et al.*, 2010).

Ferner scheint die primäre Funktion des Pilus nicht die direkte Rezeptorbindung zu sein, sondern vielmehr die Assoziation der Bakterien an die Wirtszelle, sowie der Bakterien untereinander, welche so zu engen Wirtszellkontakt und der Bildung von Mikrokolonien führt. Aggregatbildung bei Bakterien resultiert aus der Interaktion einzelner Pilusfilamente oder der Bildung von Pilusbündeln. Hier ist neben der hauptsächlichen Pilin-Untereinheit auch das Pilin-ähnliche Protein PilX von *N. meningitidis* beteiligt (Marceau *et al.*, 1995; Kirn *et al.*, 2000; Hélaine *et al.*, 2005; Helaine *et al.*, 2007). Die Bindung der Pili an die Wirtszelle sowie die Mikrokoloniebildung verändern so die Signaltransduktion der Zelle und führen zu einer lokalen Aktinpolymerisierung und Membranauffaltungen. Dies verstärkt zum einen die Interaktionsoberflächen und die Bindung der Bakterien und zum anderen schützen diese Pseudopodien die Mikrokolonien vor Scherstress im Blutstrom oder Nasopharynx (Merz *et al.*, 1999; Mairey *et al.*, 2006; Mikaty *et al.*, 2009). Darüber hinaus ermöglichen Typ IV Pili durch die Depolymerisierung oder Retraktion der Filamente, einen direkten Kontakt zur Wirtszellmembran um so die Bindung anderer Adhäsine zu gewährleisten und zu verstärken. So ist die Zytotoxizität von *P. aeruginosa* abhängig von der Retraktion des Pilus, bedingt durch das Zell-Zell Kontakt abhängige Typ III Sekretionssystem (Virji *et al.*, 1993; Pujol *et al.*, 1999; Comolli *et al.*, 1999). Neben der Adhäsion und Zellinteraktion vermitteln Typ IV Pili auch die Verbreitung und Transmigration durch Epithel- und Endothel-Zellbarrieren (Zolfaghar *et al.*, 2003; Alarcon *et al.*, 2009; Chamot-Rooke *et al.*, 2011).

Ebenfalls von zentraler Bedeutung für die Wirtszellkolonisierung und Pathogenese ist Twitching motility, eine Typ IV Pilus-abhängige Bewegungsform über halb feste Oberflächen oder Epithelien. Twitching motility erfordert die Polymerisation sowie

Depolymerisation des Pilus, um die Zelle in Richtung der Pilusspitze zu ziehen, welche an die Zieloberfläche assoziiert ist. Dieser Prozess ist ATP abhängig und wird in *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* durch die ATPase PilT energetisiert (Skerker and Berg, 2001; Mattick, 2002; Yasukawa *et al.*, 2006; Satyshur *et al.*, 2007; Misic *et al.*, 2010).

Pathogene *Neisseria spp.* haben einen zusätzlichen Mechanismus entwickelt, um eine Pilus-induzierte Immunantwort zu vermeiden. Dazu gehört zum einen die Variation von Antigenen durch posttranslationale Modifikationen der Pilin-Untereinheiten, besonders der $\alpha\beta$ -Loop und D Region der Kopfdomäne, oder zum anderen durch Rekombination der verschiedenen *pil* Gene im Chromosom (Haas and Meyer, 1986; Howell-Adams and Seifert, 1999; Craig *et al.*, 2004; Ramboarina *et al.*, 2005).

3.2.3. Typ IV Pili von *L. pneumophila*

Erstmals beschrieben wurden Pili bei *L. pneumophila* von Rodgers *et al.*, 1980 durch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen. Ferner konnten bei *L. pneumophila* Pili in verschiedener Länge beobachtet werden (siehe Abbildung 3.6). Die Bakterien exprimieren entweder kurze Pili mit einer Länge von 0,1-0,6 μm oder lange Pili mit einer Länge von 0,8-1,5 μm . Es wurde nicht beobachtet, dass beide Pilus-Typen gleichzeitig exprimiert wurden. Außerdem wiesen ca. 10 % der Bakterien lange Pili und etwa 40 % kurze Pili auf. Jedoch konnten nur bei 50 % der Bakterien überhaupt Pili beobachtet werden (Stone and Abu Kwaik, 1998).

Das *L. pneumophila* Protein PilE ist verantwortlich für die Expression von langen Pili. Vergleiche der N-terminalen Sequenz mit anderen Pilin-Proteinen zeigen eine 38 %ige Identität und eine 71 %ige Vergleichbarkeit zum *N. gonorrhoeae* PilE und 33 % Identität und 54 % Vergleichbarkeit zum *P. aeruginosa* PilA. Aufgrund der Homologien ist PilE ein Typ IV Prepilin und gehört zu der Typ IVa Klasse. PilE definierte Stämme zeigen eine verringerte Adhärenz an Makrophagen, Epithelzellen und Protozoen, jedoch keine Defekte in der intrazellulären Replikation (Stone and Abu Kwaik, 1998). Ferner ist PilE notwendig für die natürliche Kompetenz von *L. pneumophila* (Stone and Kwaik, 1999).

In Zusammenhang mit der Expression von Typ IV Pili konnte bei *L. pneumophila* die Pilus-bedingte Oberflächentranslokation Twitching Motility identifiziert werden. Dieser Phänotyp ist nicht abhängig von dem Pilin PilE sondern auch von dem Protein FimV, dessen Homolog bei *P. aeruginosa* an der Biogenese von Typ IV Pili beteiligt ist. In *L. pneumophila* zeigen *fimV* Mutanten einen Attenuation in Twitching Motility, in der Pigmentbildung sowie eine veränderte Zellmorphologie (Coil and Anné, 2009; Coil and Anné, 2010).

Die Expression von Typ IV Pili sowie die der Komponenten des Typ II Sekretionssystems sind zudem Temperatur reguliert. Die zu *P. aeruginosa* homologen Komponenten PilB PilC

und PilD, welche für die Synthese von Typ IV Pili notwendig sind, konnten ebenfalls in *L. pneumophila* identifiziert werden. Bei einem Wachstum der Bakterien bei 30 °C oder weniger, erhöhte sich die Expression dieser Gene und gleichermaßen auch die Bildung der Typ IV Pili (Liles *et al.*, 1998).

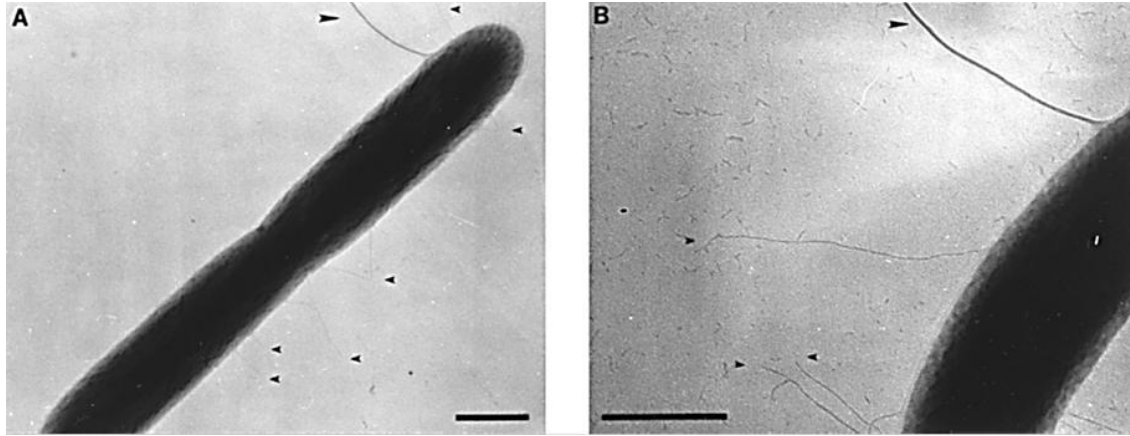


Abbildung 3.6: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila* AA100 Typ IV Pili. Pili sind durch kleine Pfeile und die Flagelle ist durch große Pfeile gekennzeichnet; A: Kurze Typ IV Pili 0.1 bis 0.6 mm; B: Lange Typ IV Pili 0.8 bis 1.5 mm. (Stone und Abu Kwaik 1998)

Die Prepilinpeptidase PilD ist ebenfalls notwendig für die Typ IV Pilusexpression. Mutationen in dem Gen *pilD* führten zu einer Reduzierung der intrazellulären Replikation in Makrophagen und Protozoen sowie im Tiermodell (Liles *et al.*, 1999). Ursächlich hierfür ist die Veränderung des Sekretionsmusters, da PilD ebenfalls an dem Aufbau des Typ II Sekretionssystems beteiligt ist. Dadurch werden die Phospholipase A sowie andere Lipasen, Hydrolasen, Phosphatasen, Proteasen und RNAsen nicht mehr sezerniert (Aragon *et al.*, 2000; Rossier and Cianciotto, 2001). Konträr zu anderen Gram-negativen Bakterien sind sowohl Typ IV Pili als auch das Typ II Sekretionssystem nicht essentiell zur Biofilmbildung von *L. pneumophila*. Als obligat intrazelluläres Pathogen spielt hier die Anwesenheit von Protozoen eine zentralere Bedeutung für die Koloniesierung von Biofilmen (Lucas *et al.*, 2006).

Durch *in vivo* Transskriptomanalysen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von einigen Pili assoziierten Genen nur intrazellulär im Wirt erfolgt. Dazu gehören die Genloci Lpp 0686 bzw. Lpp 0686-0681 (Brüggemann *et al.*, 2006). Darüber hinaus sind die weiteren Komponenten der Typ IV Pilus-Biogenese, sowie deren Funktion, als auch die Bedeutung von Typ IV Pili in der Biologie von *L. pneumophila* nicht vollständig aufgeklärt.

4. Zielsetzung

Der komplexen Interaktion zwischen *L. pneumophila* und seinen Wirtszellen liegt ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren zugrunde. Die Beeinflussung der endosomalen Reifung und die Inhibition der endolysosomalen Fusion zählen dabei zu den zentralen Faktoren für das intrazelluläre Überleben von *L. pneumophila*. Jedoch ist ein Großteil der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bislang ungeklärt. Im Vorfeld dieser Arbeit konnten in einem Transposonmutanten Screening neue potentielle Faktoren identifiziert werden, welche an der Inhibition der phagolysosomalen Fusion beteiligt sind. Hierzu zählte unter anderem das *L. pneumophila* Corby PilY1, welches als Faktor der Typ IV Pilus-Biogenese annotiert ist (Shevchuk *et al.*, 2014). In dieser Arbeit sollte PilY1 hinsichtlich seiner Funktion in der Pathogenität von *L. pneumophila* charakterisiert werden. Einen besonderen Schwerpunkt sollte hierbei die humane *L. pneumophila* Infektion darstellen.

Grundlegend für die Definition von PilY1 als Virulenzfaktor von *L. pneumophila* sollte zunächst die Verifizierung des dem Transposonmutanten Screening vorliegenden Phänotyps mittels lysosomaler Kollokalisationsstudien sein. Desweiteren sollte eine Analyse der PilY1 Expression innerhalb der *L. pneumophila* Differenzierungsstadien, des Sekretionsprofils sowie die Identifikation der subzellulären Lokalisation von PilY1 erfolgen.

Zur Untersuchung des Einflusses von PilY1 auf die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* sollten Infektionsstudien mit humanen explantierten Lungengewebe sowie humanen Makrophagen und Epithelzellen als auch mit der Amöbe *D. discoideum* durchgeführt werden. Auf diese Weise ist eine Bewertung des Einflusses von PilY1 in einer menschlichen *L. pneumophila* Infektion aber auch während der Infektion in einem natürlichen Wirtssystem möglich. Desweiteren sollte in Adhäsions- und Invasions-experimenten, die Funktion von PilY1 in der Initiation der Infektion in menschlichen und natürlichen Wirtszellsystemen, näher charakterisiert werden.

Im Hinblick auf die Annotation von PilY1 als potentieller Typ IV Pilus-Biogenese Faktor sollten außerdem die Oberflächen assoziierte Phänotypen von *L. pneumophila*, in Motilitätsstudien, identifiziert werden.

Für ein detailliertes Verständnis der biochemischen Regulation und Funktion von PilY1 sollte zusätzlich die Struktur der PilY1 Domäne sowie die Calciumbindungseigenschaften des Proteins untersucht werden.

5. Material und Methoden

5.1. Geräte

Zur Durchführung der Experimente wurden die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tabelle 5.1: Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller	Typ
Absaugpumpe	Gilson	Safe Aspirationstation
Chemilumineszenzanlage	DC Science Tec	DeVision D Box
CO ₂ Inkubator	Sanyo	MCO-18 AIC (UV) MIR-253
DNA-Gelkammer	GP Kunststofftechnik	Mini ; Midi Large
Elektroblotter	Biorad	Trans-Blot [®] Turbo PerfectBlue
	Peqlab	Semi-Dry Electro Blotter
Feinwaage	Sartorius	TE 2145
Fluoreszenzmikroskop	Leica	DM 6000 CS; TCS SP5Axioskop
	Zeiss	MI 100; Axiovert 35 M
French Press	Thermo	French Pressure Cell Press
Geldokumentationsanlage	DC Science Tec	DeVision G
Inverses Lichtmikroskop	Zeiss	Axiovert 35M
Isoelektrische Fokussierung	Biorad	PROTEAN [®] i12 [™] IEF System
Magnetrührer	IKA	Basic yellow line
	MSH	
Manuelle Einkanalpipette	Brand	Transferpette S
	Rainin	Pipet lite
Manuelle Multikanalpipette	Rainin	pipet lite XLS
Massenspektrometrie	Thermo Scientific	LTQ Orbitrap [™] XL
	Waters	SYNAPT G2 Mass Spectrometer
Microscale Thermophorese	Nano Temper Technologies	Monolith NT.115
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Thermo Scientific	VarioScan Flash
Nanodrop Spektrophotometer	Peqlab	ND-1000
pH- Meter	Metrohm	827 pH lab
Power supply	Biorad	PowerPac [™] Basic Power Supply
	Peqlab	EV222
	Peqlab	EV231
Reagenzgefäßschüttler	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Reinstwasseranlage	Millipore	MilliQ Synthesis A10
Rollenmischer	Fröbel Labortechnik	CAT RMS

Geräte	Hersteller	Typ
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	Hera Safe
Schüttelgeräte	Grant-Bio	PMR-30
	IKA	KS 130 basic
SDS-Gelkammer	Biorad	Mini-Protean Tetra Cell
	Biorad	Mini-Protean 3
	Biorad	PROTEAN® Plus Dodeca cell
Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific	Hera Safe
Spektralphotometer	Biochrom	Libra S22
Standardwaage	Sartorius	BL 1500
Thermoblock	Eppendorf	Thermomixer comfort
	Peqlab	Thriller
Thermocycler	Biometra®	Tpersonal
	Biorad	T100 Thermal Cycler
	Peqlab	Peqstar 96 Universal Gradient
Tiefkühlschrank -80 °C	Sanyo	MDF U73V
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter	Optima™ L-90K Ultracentrifuge
UV Crosslinker	Stratagene	UV Stratalinker 2400
Wasserbad	GFL	1002
Zentrifugen	Beckman Coulter	Allegra X-12R
	Eppendorf	5424
	Hermle Labortechnik	Z 216 MK
	Sigma	2 K 15 C

5.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen für Einkanal- und Mehrkanalpipetten, serologische Pipetten, Einwegküvetten, Sterilfilter, Kryoröhrchen und Reaktionsgefäße in unterschiedlichen Größen wurden über diverse Firmen wie z.B. Sarstedt, BD Falcon, Brand, Eppendorf und Greiner bio-one bezogen. Chemikalien stammen von den Firmen Carl Roth, Merck, Roche, Sigma-Aldrich, GE-Healthcare und Thermo Fischer Scientific. Spezielle Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 5.2 aufgeführt.

Tabelle 5.2: Spezielle Verbrauchsmaterialien und Chemikalien oder Reagenzien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen 25 cm ²	TPP (90026)
Zellkulturflaschen 75 cm ²	TPP (90076)
Zellkulturflaschen 150 cm ²	TPP (90151)
Multiwellplatten 24 Wells	Greiner Bio-One (665180)
Multiwellplatten 96 Wells	TPP (92424)

Bezeichnung	Bezugsquelle
Petrischale; quadratisch; 120 x 120 mm	Greiner Bio-One (688161)
13 ml Röhrchen mit Rundboden	Sarstedt (62.515.006)
UltraClear Centrifuge Tubes; 14 x 95 mm	Begman Coulter (344060)
Amicon® Ultra-2 mL Centrifugal Filters, MWCO 50 kDa	Merck Millipore (UFC205024)
Zählkammer „Fuchs-Rosenthal“	Assitent
Cytochalasin B	Santa Cruz Biotechnology (sc-3519)
PVDF/Immobilon®-P Transfer Membrane	Merck Millipore (IPVH0010; 0,45 µm)
Fluorescens Mountingmedium	Dako (S3023)
RPMI 1640	PAA (E15-817)
DMEM	PAA (E15-005)
Trypsin EDTA	PAA (L11-004)
L-Glutamine	PAA (M11-004)
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom (S0415)
Krypton™ Protein Stain	Thermo Scientific (46629)
5-(6) Caboxy-x-Rodamin	Sigma-Aldrich (21965)
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich (P8139)
Roti® - Nanoquant	Carl Roth (K880)
SERVA IPG <i>Blue</i> Strips pH 3-10 NL; 18 cm	SERVA Electrophoresis GmbH (43002)
StrataClean Resin; Beats	Agilent Technologies (400714-61)
Chelex® 100 Resin	BioRad (142153)

5.3. Kommerzielle Kits, Software und Datenbanken, Vektoren, Oligonukleotide, Enzyme, Größenstandards sowie Antikörper

5.3.1. Kommerzielle Kits

Die in dieser Arbeit wurden kommerzielle Kits unter anderem zur Mutagenese, zur Aufreinigung und Isolation von DNA oder für proteinbiochemische Nachweise verwendet. Diese sind der Tabelle 5.3 zu entnehmen.

Tabelle 5.3: Verwendete kommerzielle Kits

Bezeichnung	Referenz
Amersham ECL Western Blotting Dectetion Kit	GE Healthcare Life Sciences
Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS	Tano Temper Technologies (L001)
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega
QIAquick PCR Purification	Quiagen
QIAquick Gel Extraction	Quiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
Rapid DNA Ligation	Thermo Fischer Scientific

5.3.2. Software und Datenbanken

Die in dieser Arbeit zur Analyse oder Auswertung verwendete Software oder Datenbanken sind in Tabelle 5.4 aufgelistet.

Tabelle 5.4: Überblick über die verwendete Software und Datenbanken

Software/ Datenbank	Quelle
NCBI BLAST [®]	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Vector NTI Advance 10	Invitrogen
Prosite	http://www.expasy.ch/prosite/
SignalP 4.0 Server	https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SoftBerry ProtCompB	https://linux1.softberry.com
PSIPRED (Protein Structure Prediction	http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/
Clustal Omega; multiple sequence alignment program	European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)
GraphPad Prism5	GraphPad Software
ImageJ	http://www.imagej.net
Illustrator for Biological Sequences (IBS)	Liu <i>et al.</i> , 2015
Simple Modular Architecture Research Tool	Letunic <i>et al.</i> , 2015
Adobe Photoshop 7.0.1	adobe

5.3.3. Vektoren

Die zur Mutagenese, Komplementation und Heterologen Genexpression verwendeten Vektoren oder Plasmide sind in der Tabelle 5.5 aufgelistet. Die entsprechenden Vektorkarten sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Abbildung 8.1).

Tabelle 5.5: Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pGEM [®] -T Easy Vector	linearisierter Vektor, mit terminalen Thymidinen an beiden 3' Enden; T7 und SP6 Promoter; α -Fragment der β -Galactosidase; Ampicillin ^r .	Promega
pXDC61	aus pMMB207C; <i>tac</i> Promotor; <i>blaM</i> Insertion; Chloramphenicol ^r .	Charpentier <i>et al.</i> , 2009
pASK-IBA7plus	N-terminaler <i>Strep</i> [®] -tag; Faktor Xa Schnittstelle; <i>tet</i> -Promotor Ampicillin ^r .	iba
pETTSC:: <i>plaO1</i>	aus pET-21a+ mit C-terminalen <i>Strep</i> [®] -tag II und a TEV-Protease Schnittstelle; T7 Promotor; Ampicillin ^r .	Jörn Krause, HZI Braunschweig
pvp008HA	C-terminaler Hisactophilin Tag; TEV-Protease Schnittstelle; T7 Promotor; Kanamycin ^r .	Jörn Krause, HZI Braunschweig
pvp008ZZ	C-terminaler Double ZZ Tag; TEV-Protease Schnittstelle; T7 Promotor; Kanamycin ^r .	Jörn Krause, HZI Braunschweig

5.3.4. Oligonukleotide

Die zur Mutagenese und der anschließenden Sequenzierung verwendeten Primer bzw. Oligonukleotide sind in der Tabelle 5.6 aufgelistet. Diese wurden von den Unternehmen Eurofins und Biomers bezogen.

Tabelle 5.6: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>pilY1</i> Deletionsmutagenese	
PilYup F	GTTGAATATGGCTCATAGCGTCCATGATAATCAAACC
PilYup R	CTCAAACCCAACTTTACAAAGC
PilYdown F	TAAAAACCTTGCAGGAATACGG
PilYdown R	TTGTAACACTGGCAGAGGCAAATTCAATAGAGGATACCC
Kmfull F	TCTGCCAGTGTTACAACCAATT
Kmfull R	ATGAGCCATATTCAACGGGA
PilYconf F	GGCAGATTAATTGTAATGTCAGTGT
PilYconf R	CCAGGATTTTCATTAGTCGAGTTAAT
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	TATTTAGGTGACACTATAG
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
<i>pilY1</i> Komplementationskonstrukte	
PilYcom F <i>XbaI</i>	GCGCGTCTAGATTGAATTTGCCACCAGCC
PilYcom R <i>EcoRI</i>	GCGCGGAATTCGGTTTTGATTATCATGGACGC
PilYvWF F <i>XbaI</i>	GCGCGTCTAGAAATTGATACCAGGGAATCAA
PilY-vWF F	ACTGGTTGTACCCACAGTT
PilYdom R	TGGTCAACTAACCGAAAG
pXDC61 F	TTGACAATTAATCATCGGC
pXDC61 R	CTGTATCAGGCTGAAAATC
Klonierung von <i>pilY1</i> Fusionsproteinen	
PilYdomN F <i>SacI</i>	GAGCTCTGGTCAACTAACCGAAAG
PilYdomN R <i>PstI</i>	CTGCAGTTGAATTTGCCACCAGCC
PilY1domC F <i>NdeI</i>	CATATGTGGTCAACTAACCG
PilY1domC R <i>HindIII</i>	AAGCTTTTGAATTTGCCACCA
PilY1fullL F <i>NdeI</i>	CATATGGACGCTTTAACATTTTG
PilY1fullL R <i>BstBI</i>	TTCGAATTGAATTTGCCACCAG
PilYdom-pvp F <i>NotI</i>	GCGGCCGCTGGTCAACTAAC
PilYdom-pvp R <i>HindIII</i>	AAGCTTTCATTGAATTTGCCACCA
pASK-IBA F	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK-IBA R	CGCAGTAGCGGTAAACG
PilYseq I	CCGTGGAATATCAAGCCAAC

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
PilYseq II	TGAAAATGCAGGTGGTA
PilYseq III	AACCAACTCCACTGCGACC

5.3.5. Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie weitere Enzyme sind in Tabelle 5.7 aufgelistet.

Tabelle 5.7: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Referenz
Restriktionsendonukleasen	
<i>Bst</i> BI	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs
<i>Eco</i> RV	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	New England Biolabs
<i>Not</i> I	New England Biolabs
<i>Pst</i> I	New England Biolabs
<i>Sac</i> I	New England Biolabs
<i>Xba</i> I	New England Biolabs
Weitere Enzyme	
Tag DNA-Polymerase	New England Biolabs
Long Amp [®] DNA-Polymerase	New England Biolabs
Q5 [®] DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Benzonase [®] Nuklease	Sigma-Aldrich
Trypsin	

5.3.6. Größenstandards (DNA und Proteine)

Als Standards zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde die Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (#SM1331) von Fermentas/ Thermo Fischer Scientific verwendet. Als Größenstandrat für Proteine in Polyarcylamidgelen wurde je nach Anwendung entweder die Page Ruler Prestained Protein Ladder (#SM0672) von Fermentas/ Thermo Fischer Scientific oder Precision Plus Protein[™] Unstained Standard (#1610363) von BioRad verwendet (siehe Abbildung 5.1). Diese wurden nach den Angaben der Hersteller für die Chromatographie eingesetzt und gegeben falls verdünnt.

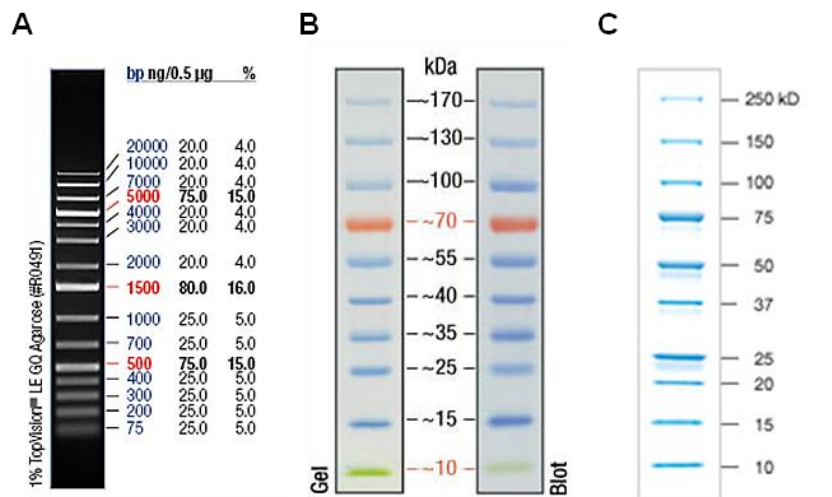


Abbildung 5.1: Verwendete DNA und Protein Größenstandarts

(A) Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermantas/ Thermo Fischer Scientific); (B) PageRuler prestained Protein Ladder (Fermantas/ Thermo Fischer Scientific), (C) Precision Plus Protein™ Unstained Standard (BioRad)

5.3.7. Antikörper

Die in dieser Arbeit für Immunfluoreszenz Färbungen oder Western Blot Analysen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5.8 aufgelistet.

Tabelle 5.8: Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Referenz
Rabbit-anti <i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1-12	www.Antikörper-online.de
Rabbit-anti PliY1 927 1-2 (aa 359-370)	Eurogentec; Julia Hoppe, 2011
Mouse-anti Mip 2D8	Helbig, Ludwig, <i>et al.</i> , 1995
Rabbit-anti FlaA	Heuner <i>et al.</i> , 1995
Rabbit-anti MOMP	Vincent <i>et al.</i> , 2006
Rabbit-anti LepB	Vincent <i>et al.</i> , 2006
Mouse-anti Mannose-6-Sulfat (aus <i>D. discoideum</i>)	Neuhaus <i>et al.</i> , 1998
Goat-anti Mouse alkaline phosphatase Konjugat	Thermo Fischer Scientific
Goat-anti Rabbit alkaline phosphatase Konjugat	Thermo Fischer Scientific
Goat-anti Mouse horseradish peroxidase Konjugat	Dianova
Goat-anti Rabbit horseradish peroxidase Konjugat	Dianova
Goat-anti Mouse Alexa-488 conjugate	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific
Goat-anti Rabbit Alexa-488 conjugate	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific
Goat-anti Rabbit Alexa-568 conjugate	Invitrogen/Thermo Fischer Scientific

5.4. Bakterienstämme und Zellen

Die Tabelle 5.9 zeigt die in dieser Arbeit für *L. pneumophila* Corby Infektionsstudien verwendeten eukaryotischen Zellen und Zelllinien.

Tabelle 5.9: Verwendete Zellenlinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Dictyostelium discoideum</i> AX2	Axenischer Stamm	M. Schleicher, LMU München
Makrophagenzelllinie THP-1	Humane leukemische Monozyten, Lymphomzelllinie	ACC16; DSMZ
Lungenepithelzelllinie A-549	Epithelzellen aus humanem Lungenkarzinom	ACC107; DSMZ

In folgender Tabelle 5.10 sind die in dieser Arbeit verwendeten oder durch Mutagenese erzeugten Bakterienstämme aufgelistet.

Tabelle 5.10: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Legionella pneumophila</i> Corby	Patientenisolat; Phänotyp WT; Serogruppe 1	(Jepras <i>et al.</i> , 1985)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby <i>dotA</i> ⁻	LPC_0450/ <i>dotA</i> ::mini-Tn5 Insertion; Km ^r	A. Flieger, RKI
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ <i>dotA</i>	<i>dotA</i> :: <i>nptI</i> ; Km ^r	
<i>Legionella pneumophila</i> Corby D1	LPC_2666/ <i>pilY1</i> ::mini-Tn10 Insertion; Typ IV Pili Biogenese; <i>PilY1</i> homolog; Km ^r	(Shevchuk <i>et al.</i> , 2014)
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ <i>pilY1</i>	<i>pilY1</i> :: <i>nptI</i> ; Km ^r	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ <i>pilY1</i> WT <i>pilY1</i>	<i>pilY1</i> :: <i>nptI</i> ; komplementiert mit <i>pilY1</i> kloniert in pXDC; Km ^r /Cm ^r	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ <i>pilY1</i> Δ <i>pilY1</i> dom	<i>pilY1</i> :: <i>nptI</i> ; komplementiert mit <i>PilY1</i> Domäne; <i>pilY1</i> Δ 1212-1793 bp kloniert in pXDC; Km ^r /Cm ^r	Diese Arbeit
<i>Legionella pneumophila</i> Corby Δ <i>pilY1</i> Δ vWF	<i>pilY1</i> :: <i>nptI</i> ; komplementiert mit vWFA Domäne; <i>pilY1</i> Δ 1792-3506 bp kloniert in pXDC; Km ^r /Cm ^r	Diese Arbeit
<i>Escherischia coli</i> DH10 β	<i>F</i> <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> Δ <i>lacX74</i> Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>araD139</i> Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) λ ⁻ Sm ^r	Invivogen

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Escherischia coli</i> Rosetta Gami-2 (DE3)	<i>Tet Str^r Cam</i>	Merck Millipore
<i>Escherischia coli</i> DH10 β pGEM [®] -T <i>pilY1::nptI</i>	pGEM [®] -T <i>pilY1::nptI</i> ; Amp ^r	Diese Arbeit
<i>Escherischia coli</i> DH10 β pASK <i>pilY1dom</i>	<i>pilY1</i> 1764-3506 bp kloniert in pASK-IBA7 plus mit N-terminalem <i>Strep[®]</i> -tag; Faktor Xa Schnittstelle; Amp ^r	Diese Arbeit
<i>Escherischia coli</i> DH10 β pETTSC <i>pilY1dom</i>	<i>pilY1</i> 1764-3506 bp kloniert in pETTSC:: <i>plaO1</i> mit C-terminalem <i>Strep[®]</i> -tag II; TEV-Protease Schnittstelle; Amp ^r	Diese Arbeit
<i>Escherischia coli</i> DH10 β pETTSC <i>pilY1</i>	<i>pilY1</i> kloniert in pETTSC:: <i>plaO1</i> mit C-terminalem <i>Strep[®]</i> -tag II; TEV-Protease Schnittstelle; Amp ^r	Diese Arbeit
<i>Escherischia coli</i> DH10 β pvp008HA <i>pilY1dom</i>	<i>pilY1</i> 1764-3506 bp kloniert in pvp008HA mit C-terminalem Hisactophilin Tag; TEV-Protease Schnittstelle; Km ^r	Diese Arbeit
<i>Escherischia coli</i> DH10 β pvp008ZZ <i>pilY1dom</i>	<i>pilY1</i> 1764-3506 bp kloniert in pvp008HA mit C-terminalem Double ZZ Tag; TEV-Protease Schnittstelle; Km ^r	Diese Arbeit
<i>Escherischia coli</i> Rosetta Gami-2 (DE3) pvp008ZZ <i>pilY1dom</i>	<i>pilY1</i> 1764-3506 bp kloniert in pvp008HA mit C-terminalem Double ZZ Tag; TEV-Protease Schnittstelle; <i>Tet Str^r Cam</i> Km ^r	Diese Arbeit in Kooperation mit Jörn Krause und Claudia Hanko, HZI Braunschweig

5.5. Bakteriologische Methoden

5.5.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung der *L. pneumophila* Corby Stämme erfolgte auf „Buffered Charcoal Yeast Extract“-Agarplatten (BCYE) bei 37 °C und 5 % CO₂ für drei bis vier Tage, bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase. *L. pneumophila* Corby Flüssigkulturen wurden in „Yeast Extract Broth“-Flüssigmedium (YEB) in Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 37 °C und 200 rpm bis zur stationären Phase angezogen. BCYE und YEB-Medium wurden zur Kultivierung mutagenisierter Stämme gegebenenfalls mit den Antibiotika 20 µg/ml Kanamycin oder Chloramphenicol versetzt. Die Zusammensetzungen der benötigten Medien zur Kultivierung von *L. pneumophila* Corby sind in Tabelle 5.11 aufgelistet.

Tabelle 5.11: Zusammensetzung der verwendeten *Legionella* Kulturmedien
„Buffered Charcoal Yeast Extract“-Agar (BCYE)

5 g	ACES	GERBU
10 g	Yeast Extract (Bacto™) auf 900 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen pH Wert auf 6,9 mit 10 M KOH einstellen	BD
2 g	Aktivkohle	Fulka
15 g	Agar autoklavieren und nach Abkühlung auf ~ 50 °C	
0,4 g	Cystein in 10 ml H ₂ O _{bidest.} gelöst und sterilfiltriert	
10 ml	sterile Fe(NO) ₃ x 9 H ₂ O Lösung (25 g/l)	

„Yeast Extract Broth“-Flüssigmedium (YEB)

10 g	ACES	GERBU
10 g	Yeast Extract (Bacto™) auf 1000 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen pH Wert auf 6,9 mit 10 M KOH einstellen	BD
0,4 g	Cystein in 10 ml H ₂ O _{bidest.} gelöst	
0,25 g	Eisenpyrophosphat in 10 ml H ₂ O _{bidest.} gelöst Medium sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)	

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden auf „Lysogeny Broth“-Agarplatten (LB) bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden die Bakterien in flüssiges LB-Medium überführt und für 16 h bei 37 °C, 200 rpm in Erlenmeyerkolben mit Schikanen oder Reagenzgläsern angezogen (siehe Tabelle 5.12). LB-Agar und Flüssigmedium wurden, wenn nicht anders angegeben, zusätzlich mit entsprechenden Antibiotika versetzt.

Tabelle 5.12: Zusammensetzung des verwendeten Mediums für *E. coli* Stämme
„Lysogeny Broth“-Medium (LB)

10 g	Caseinpepton	Roth
5 g	Yeast Extract (Bacto™)	BD
5 g	Natriumchlorid	
15 g	Agar (ggf.) auf 1000 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen und autoklavieren	

5.5.2. Kryokonservierung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung wurde der Bakterienrasen einer bewachsenen Agarplatte mit 1 ml PBS abgespült und mit 86 %igem Glycerin im Verhältnis 1:2 versetzt (siehe Tabelle 5.13). Die Bakteriensuspension wurde anschließend in ein Kryoröhrchen überführt und bei

-80 °C gelagert. Bei Bedarf konnten die Kryoröhrchen entnommen werden und wurden auf einer gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde, je nach Anforderungen des jeweiligen Stammes, 1 bis 3 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 5.13: Zusammensetzung der PBS-Stocklösung
10x PBS (1:10 verdünnen für 1x PBS)

80 g	NaCl
2 g	KCl
14,4 g	Na ₂ HPO ₄
2,4 g	KH ₂ PO ₄
	auf 1000 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen
	pH Wert auf 6,0 mit 10 M NaOH einstellen und autoklavieren

5.5.3. Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Der *E. coli*-Stamm DH10 β wurde aus einer stationären Kultur in einer 1:100 (v/v) Verdünnung in 250 ml LB-Medium und 20 mM MgSO₄ angeimpft und bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4-0,7 inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 5 min bei 4000-6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 0,4 Volumen des Überstandes in eiskaltem TFB-1-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min auf Eis wurden die Zellen für 5 min bei 4000-6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem 1/25 Volumen der Ausgangskultur mit eiskaltem TFB-2-Puffer resuspendiert und nochmals für 15-60 min auf Eis inkubiert. Die chemisch-kompetenten Zellen konnten anschließend in 100-200 μ l Aliquots bei -80 °C gelagert. Nach einer Lagerung von drei Monaten nahm die Ausgangskompetenz der Zellen nicht mehr gegeben. Die Zusammensetzung der benötigten Puffer ist der Tabelle 5.14 zu entnehmen.

Tabelle 5.14: Zusammensetzung der zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* benötigten Puffer
TFB-1 Puffer

30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
100 mM	RbCl
15 %	Glycerin (v/v)
	mit 1 M Essigsäure pH 5,8 einstellen
	sterilfiltrieren (0,2 μ m Porengröße), Lagerung bei 4 °C
30 mM	Kaliumacetat
10 mM	CaCl ₂

TFB-2 Puffer	
10 mM	MOPS oder PIPES
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15 %	Glycerin (v/v)
	mit 1 M KOH pH 6,5 einstellen
	sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße), Lagerung bei 4 °C

5.5.4. Herstellung elektrokompenter *L. pneumophila* Zellen

Von einer exponentiellen *L. pneumophila* Kultur (OD_{600 nm} von 1,5-2) in YEB wurden 100 µl auf einer BCYE-Agarplatte ausplattiert und 24 h inkubiert bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Bakterienrasen wurde daraufhin mit 1 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin abgespült. Danach werden die Zellen bei 5.000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Wachsritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen auf eine OD_{600 nm} von ca. 100 in eiskaltem 10 %igem Glycerin eingestellt und in 50 µl Aliquots auf Eis abgefüllt. Die kompetenten *L. pneumophila* Zellen können nicht eingefroren werden, sondern müssen direkt zur Transformation benutzt werden.

5.5.5. „Twitching Motility“

Um die Typ IV Pilus-abhängige Motilität zu überprüfen, wurde ein „Twitching Motility“ Assay nach Coil und Anné, 2009 durchgeführt. Hierzu wurden ca. 20 µl einer stationären *L. pneumophila* Corby Übernachtskultur in YEB, mit einer OD_{600 nm} von 3,5-4, auf eine BCYE-Platte mit 1,6 % Agar getropft (siehe Tabelle 5.11). Nach dem Eintrocknen des Tropfens wurden die Platten für 14 Tage bei 30 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Platten fotografiert und der entstandene Schwärmsaum um die Kolonie vermessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop 7.1, indem die gemessenen Pixel mit der Fläche der Petrischale in Verhältnis gesetzt wurden. Die Schwärmsäume der *L. pneumophila* Corby Stämme konnten so miteinander verglichen und statistisch quantifiziert werden.

5.5.6. „Sliding Motility“

Für die Analyse der Pilus-unabhängigen Motilität „Sliding Motility“ wurde der Assay nach Stewart *et al.* 2009 durchgeführt. Dafür wurden *L. pneumophila* Corby Vorkulturen in YEB bei 37 °C und 200 rpm bis zur stationären Phase mit einer OD_{600 nm} von 3,5-4 geschüttelt. Anschließend wurden 10 µl dieser Kultur auf eine BCYE-Platte mit einer Agarkonzentration von 0,5 % aufgetropft und trocknen gelassen (siehe Tabelle 5.11). Hierbei durften die BCYE-Agarplatten nicht älter als 24 h sein, um eine mögliche Austrocknung zu vermeiden.

Die Kulturen wurden im weiteren Verlauf für 14 Tage bei 30 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurden die gewachsenen Kolonien fotografiert und die Größe der Schwärmsäume wurde mit dem Programm „Adobe Photoshop 7.1“ durch das Verhältnis gemessenen Pixel zu der Fläche der Petrischale ausgewertet. Die Schwärmsäume der *L. pneumophila* Corby Stämme wurden auf diese Weise miteinander verglichen und statistisch quantifiziert.

5.6. Zellbiologische Methoden

5.6.1. Kultivierung von *D. discoideum*

Die Kultivierung von *D. discoideum* AX2 erfolgte in HL5-Medium (siehe Tabelle 5.15). Die Kulturen wurden hierzu aus einer Ausgangskultur in einer 1:10 (v/v) Verdünnung in HL5 Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben inokuliert und bei 25 °C, schüttelnd mit 180 rpm für 3 Tage inkubiert (siehe 5.6.2). Die angezogenen Zellen konnten anschließend für weiterführende Infektionsstudien eingesetzt werden.

Tabelle 5.15: Zusammensetzung des verwendeten *D. discoideum* Kulturmediums

HL5 Medium		
14,3 g	Microbio. Proteose Peptone	Oxoid BD
7,15 g	Hefeextrakt	
18 g	Maltosemonohydrat	
0,641 g	Na ₂ HPO ₄	
0,49 g	K ₂ HPO ₄	
	auf 1000 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen	
	pH Wert auf 6,9 mit 10 M KOH einstellen	
	Medium mit „On-Top-Bottel-Filter“ (0,2 µm Porengröße) sterilfiltrieren	

5.6.2. Kryokonservierung von *D. discoideum*

Für die Langzeitkonservierung von *D. discoideum* AX2 wurden Sporen generiert. Dazu wurden die vegetativen AX2-Zellen in Erlenmeyerkolben mit 25 ml HL5-Medium bei 25 °C und 180 rpm 3-4 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen für 7 min bei 233 g zentrifugiert, mit 10 ml 1x Soerensen-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (siehe Tabelle 5.16). Das gewaschene Zellpellet wurde in 1x Soerensen-Puffer resuspendiert und auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt (siehe 5.6.9). Jeweils 500 µl der Zellsuspension auf 1,5 % Soerensen-Agarplatten durch schwenken verteilt. Nach 48-Stunden Inkubation bei 25 °C wurden die Sporen mit 2 ml Soerensen-Puffer von den Agarplatten gespült, auf Kryoröhrchen verteilt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Reanimation wurden die Zellen auf Eis langsam aufgetaut und in 25 ml HL5-Medium aufgenommen und für 3-

4 Tage bei 25 °C und 180 rpm inkubiert. Diese angewachsene Vorkultur wurde 1-2 Wochen bei 4 °C gelagert, um erneute Kulturen zu beimpfen.

Tabelle 5.16: Verwendete Stocklösung für 1x Soerensen-Puffer

50 x Soerensen-Puffer (1:50 (v/v) verdünnen für 1x Soerensen-Puffer)

99.86 g	K ₂ HPO ₄
17.8 g	Na ₂ HPO ₄
	auf 1000 ml mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen
	pH Wert auf 6,0 mit 10 M KOH einstellen und autoklavieren

5.6.3. Kultivierung von A549 Epithelzellen

A549 Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils 20 ml DMEM-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das DMEM-Medium wurde vor dem Gebrauch mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin versetzt. Wenn die Zellkulturflasche nach 3-4 Tagen konfluent bewachsen war, konnte diese gesplittet oder für experimentelle Zwecke genutzt werden (siehe 5.6.4).

5.6.4. Splitten von A549 Epithelzellen

Die A549 Zellen wurden gesplittet, wenn die Kultur zu 80-90 % konfluent war. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch die Zugabe von 5 ml warmem Trypsin-EDTA und eine Inkubation bei 37 °C von ca. 5-10 min vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Trypsin Behandlung wurde durch Zugabe von 5 ml RPMI-Medium gestoppt, und die Zellen anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 100 g für 5 min zentrifugiert und in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in 1:20 (v/v) Verdünnung eine neue 75 cm² Zellkulturflasche mit DMEM-Medium überführt und bei und 5 % CO₂ kultiviert. Das Splitten der Zellen erfolgte in einem Abstand von 3-4 Tagen. Hatten die Zellen die Passage 10-12 erreicht wurde eine neue Kultur erstellt.

5.6.5. Kultivierung von THP-1 Makrophagen

THP-1 Zellen wurden in 75 cm² und 150 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils 20 oder 50 ml RPMI Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Dem RPMI 1640 wurden vor dem Gebrauch 10 % FCS, sowie 2 mM L-Glutamin hinzugefügt. Wenn die Zellsuspension nach 3-4 Tagen dicht bewachsen war, konnte diese für Experimente ausdifferenziert oder gesplittet werden (siehe 5.6.7 und 5.6.6).

5.6.6. Splitten von Makrophagen

Bei einer Zelldichte von 1-2 x 10⁶ /ml wurde die Zellsuspension für Experimente verwendet oder gesplittet. Beim Splitten wurde eine 1:10 (v/v) Verdünnung der Ausgangs-Zellsuspension mit neuem RPMI-Medium in eine neue Zellkulturflasche überführt und bei

37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Splitten der Zellen erfolgte in einem Abstand von 3-4 Tagen. Hatten die Zellen die Passage 10-12 erreicht wurde eine neue Kultur aufgetaut.

5.6.7. Ausdifferenzieren von THP-1 Makrophagen

Zur Verwendung der THP-1 Makrophagen in einem Infektionsversuch, mussten diese zuvor ausdifferenziert werden. Hierfür wurden die Makrophagen einer konfluent bewachsenen Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in RPMI-Medium resuspendiert. Nach dem Einstellen der gewünschten Zellzahl wurden pro ml Zellsuspension 100 nM Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen in eine entsprechende Multiwell-Platte ausgesät und für 48 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ ausdifferenziert. Die ausdifferenzierten Makrophagen adhärten konfluent an dem Kulturgefäß.

5.6.8. Kryokonservierung von tierischen Zelllinien

Um eine langfristige Arbeit mit den Zelllinien zu gewährleisten, wurden Kryostablate angefertigt. Zur Konservierung wurden konfluente Kulturen, gegebenenfalls mit Trypsin abgelöst, und die Zellsuspension für 10 min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und anschließend das Zellpellet aus einer 75 cm² Zellkulturflasche in 2 ml Konservierungsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt (siehe Tabelle 5.17). Zunächst wurden die Röhrchen über Nacht in einem Nalgene Cryo 1C Freezing Container, welcher mit Isopropanol gefüllt ist, bei 80 °C gelagert. Dadurch wurden die Röhrchen um 1 °C pro Minute langsam abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Stablate entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt.

Tabelle 5.17: Zusammensetzung des verwendeten Konservierungsmediums
Konservierungsmedium THP-1 Makrophagen

80 %	RPMI 1640/DMEM; 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin
10 %	hitzeinaktiviertes FCS
10 %	DMSO (v/v)
	sterilfiltrieren (0,2 µm Filter)

Für die Reanimation aus flüssigem Stickstoff, wurden die Zellen auf Eis gelagert. Danach wurden die Röhrchen in einem 37 °C Wasserbad langsam aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die THP-1 Zellen in 10 ml warmem Medium aufgenommen, um das DMSO zu entfernen und anschließend für 5 min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml neuem RPMI-Medium resuspendiert. Die A549 Zellen wurden direkt in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit 10 ml DMEM-Medium überführt. Das

DMSO wurde von den adhärennten Zellen durch einen Medienwechsel entfernt. Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

5.6.9. Bestimmung der Zellzahl

Die Konzentration der Zellen wurde mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Diese enthält 4x4 Großquadrate, die wiederum in 4x4 Kleinquadraten unterteilt sind. Zur Auszählung wurde die Kammer mit der Zellsuspension in der entsprechenden Verdünnung beladen und im Anschluss mindestens 4 Großquadrate ausgezählt. Die Ergebnisse wurden gemittelt und mit dem Kammerfaktor multipliziert, welcher sich aus den Ausmaßen der Zählkammer ergibt, (Gesamtfläche: 16 mm², Tiefe 0,2 mm, Rauminhalt: 3,2 µl). Dadurch konnte die Zellzahl pro Milliliter ermittelt werden.

5.7. Infektionsbiologische Methoden

5.7.1. Kolokalisationsstudien von LCVs in *D. discoideum*

Die Kolokalisation von *L. pneumophila* Corby Mutanten mit den Lysosomen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe Shevchuk *et al.*, 2014). Zunächst wurden die Bakterien mit Rhodamin markiert. Dafür wurden stationäre *L. pneumophila* Corby Kulturen mit sterilem 1 x PBS von der BCYE-Agarplatte abgespült. Mittels OD_{600nm} Messung wurde die Keimzahl bestimmt und eine Zellzahl von 1 x 10⁹ Bakterien/ml eingestellt. Die Bakterien wurden 5 min bei 2000 g zentrifugiert und erneut in 1 x PBS resuspendiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit 10 µl 30 mM Rhodamin in DMSO versetzt und die Suspension 30 min bei 300 rpm im Dunkeln geschüttelt. Zum Entfernen des überschüssigen Rhodamins wurden die Bakterien viermal mit je 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen. Im Anschluss wurden die gefärbten Bakterien in 1 ml 1 x Soerensenpuffer aufgenommen. Der Wirtsorganismus *D. discoideum* AX2 wurde auf eine Konzentration von 4 x 10⁵ Zellen/ml in Infektionsmedium (1:1 (v/v) Verdünnung von HL5 und 1 x Soerensenpuffer) eingestellt. Davon wurden 500 µl in die vorbereiteten 24-Well Platten ausgesät, in die je ein steriles Deckgläschen pro Well platziert wurde. Die Zellen wurden für 3-60 min bei 25 °C inkubiert. Die adhärennten *D. discoideum* Wirtszellen wurden anschließend durch die Zugabe von 40 µl der zuvor mit Rhodamin markierten *L. pneumophila* Corby Stämme infiziert. Dies entspricht einer MOI (Multiplication of Infection) von 100. Der Infektionsansatz wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 233 g synchronisiert und anschließend zweimal mit Infektionsmedium gewaschen. Nach 4-Stunden Inkubation wurden die infizierten Zellen dreimal mit 500 µl kaltem SorC-Puffer (1 x Soerensenpuffer und 40 µM CaCl₂) gewaschen und mit -20 °C kaltem Methanol für 30 min fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit 2 % humanem AB-Serum in SorC Puffer (Blocking-

Puffer) geblockt und anschließend in 30-40 µl Tropfen des 1:1000 verdünnten mouse anti-M6S Antikörpers auf Parafilm für ein bis zwei Stunden inkubiert. Dieser Antikörper erkennt Mannose-6-Sulfat Epitope der lysosomalen Enzyme von *D. discoideum*. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit 500 µl Blocking-Puffer, erfolgte eine Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten Alexa Fluor 488 gekoppelten goat anti-mouse IgG für eine Stunde bei RT im Dunkeln. Die Deckgläser wurden erneut dreimal mit 500 µl Blocking-Puffer gewaschen und die DNA wurde mit 1 µg/ml DAPI in 1 x PBS markiert und darauffolgend zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten mit DAKO Mountingmedium auf Objektträgern fixiert.

Die so präparierten Proben wurden mit einem konfokalen Breitbandmikroskop untersucht und insgesamt mindestens 300 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten untersucht. Die Quantifizierung der Kolo-kalisation der LCVs mit den Lysosomen erfolgte mit dem Programm ImageJ. Als erstes wurden die Bilder ins 8-bit Format transformiert (Image → Color → Split Channels). Als zweites wurde der rote Kanal aktiviert und der Schwellenwert eingestellt (Image → Adjust → Threshold). Zuletzt wurden die zu bestimmenden Parameter eingestellt (Analyze → Set Measurements), indem „Integrated density“, „Limit to Threshold“, „Area“, und „Redirect to green“ ausgewählt wurden. Die Abgrenzungen der Bakterienzellen wurden mit dem „Wand tracing tool“ umrandet und gemessen (Analyze → Measure). Insgesamt wurden 100 Bakterien in jedem der drei biologischen Replikate vermessen. Für die Ermittlung der „lysosomal marker association“ wurden die gemessenen „integrated Density“-Werte durch die „Area“-Werte geteilt. Der Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwerts wurden mit GraphPad Prism 5 dargestellt.

5.7.2. Infektionsassay mit *D. discoideum*

Zur Analyse des Replikationsverhaltens von *L. pneumophila* Corby Mutanten in *D. discoideum* wurden die Zellen mit einer MOI 0,02 infiziert. Diese geringe MOI bietet den Vorteil, dass jedes Bakterium von einer Wirtszelle aufgenommen wird und somit ist keine nachfolgende Behandlung mit Antibiotika zum Abtöten extrazellulärer Bakterien nicht erforderlich. Zunächst wurden 5×10^5 Zellen/ml in 25 cm² Zellkulturflaschen in einem Volumen von 5 ml Infektionsmedium ausgesät. Nach 30-40 min der Adhärenz der *D. discoideum* Zellen an die Zellkulturgefäße erfolgte die Infektion mit 50 µl einer zuvor eingestellten Bakteriensuspension. Hierzu wurden stationäre *L. pneumophila* Corby Kulturen mit sterilem 1 x PBS von der BCYE-Agarplatte abgespült und auf eine Zellzahl von 1×10^6 Bakterien/ml eingestellt. Die Infektion erfolgte über 94 Stunden bei 25 °C. Zu den Zeitpunkten 2, 24, 48, 72 und 94 Stunden wurden durch Abklopfen die *D. discoideum* Zellen von der Zellkulturflasche gelöst und jeweils 200 µl des Infektionsansatzes entnommen. Vor dem Ausplattieren wurden die Proben auf mit 800 µl H₂O_{bidest.} versetzt und

anschließend für 7 min bei 20200 g zentrifugiert sowie auf höchster Stufe ca. 15 sec. gevortext, um die *Dictyostelium* Zellen mechanisch zu zerstören und die Bakterien in das Medium freizusetzen. Von der Suspension wurden in einer 96-Wellplatte mit H₂O_{bidest.} 1:10 Verdünnungen erstellt und jeweils 20 µl auf quadratischen BYCE-Platten (120 x 120 mm) ausplattiert. Nach 3-4 tägiger Inkubation der Platten bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Kolonien ausgezählt und die koloniebildenden Einheiten (*Colony Forming Units*, CFU) pro Milliliter bestimmt.

5.7.3. Infektionsassay mit THP-1 Makrophagen

Für die intrazelluläre Replikation der *L. pneumophila* Corby Mutanten in THP-1 Makrophagen wurden 48 vor der Infektion 1×10^5 THP-1 Zellen/Well in 96-Well-Platten ausdifferenziert (siehe 5.6.7). Für die Infektion wurden stationäre *L. pneumophila* Corby Kulturen mit sterilem 1 x PBS von der BCYE-Agarplatte abgespült und auf eine Zellzahl von 1×10^6 Bakterien/ml in RPMI Medium eingestellt. Die ausdifferenzierten Makrophagen wurden im folgendem mit je 100 µl der Bakteriensuspension infiziert, was einer MOI von 1 entspricht. Der Infektionsansatz wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 300 g synchronisiert und anschließend für 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde der Ansatz dreimal mit 200 µl warmen PBS gewaschen, um die verbliebenen extrazellulären Bakterien zu entfernen. Aufgrund der geringen MOI wurde hier auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet. Die Infektion erfolge über 48 h und im weiteren Verlauf wurden die 2 h, 24 h und 48 h-Werte ausplattiert, indem in jedes Well zusätzlich mit 50 µl sterilem 1 % Triton X-100 in 1 x PBS versetzt wurde. Der durch Triton X-100 hervorgerufene Lyseprozess der Makrophagen, wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren beschleunigt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungsstufen in H₂O_{bidest.} erstellt und auf BCYE-Agar ausplattiert. Diese Platten wurden für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert und hinsichtlich der CFU/ml ausgewertet.

5.7.4. Infektionsassay A549 Epithelzellen

Zur Analyse der Vermehrungsfähigkeit der *L. pneumophila* Corby Mutanten in A549 Epithelzellen wurden am Vortag des Experiments 5×10^5 Zellen/Well in DMEM Medium in eine 24-Well-Platte ausgesät. Die Infektion der konfluenten Zellen erfolgte mit einer MOI von 10, dies entspricht 5×10^6 Bakterien/Well in jeweils 500 µl DMEM Medium. Hierzu wurden die *L. pneumophila* Corby Stämme nach 3-4 tägiger Kultivierung von den BCYE-Agarplatten mit 1x PBS abgespült und mittels OD_{600nm} Messung die Keimzahl bestimmt. Im Anschluss wird der Infektionsansatz durch Zentrifugation für 5 min bei 300 g synchronisiert und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 37 °C warmen 1x PBS gewaschen. Um alle nicht internalisierten, extrazellulären Bakterien abzutöten, erfolgte eine einstündige Inkubation unter

Standardbedingungen mit 100 µg/ml Gentamycin im DMEM Medium. Nach der Gentamycin-Behandlung wurden die Zellen erneut zweimal mit 37 °C warmem 1x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Infektion über 48 h. Nach jeweils 2 h, 24 h und 48 h der Infektion wurden die Wirtszellen mit 0,01 % Triton X-100 lysiert. Dieser Lyseprozess wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren beschleunigt. Die Suspension mit den freien Bakterien wurde in einer 96-Well-Platte mit H₂O_{bidest.} verdünnt und jeweils 20 µl der einzelnen Verdünnungsstufen auf BCYE-Platten ausplattiert. Nach 3-4 tägiger Inkubation der Platten bei 37 °C, 5 % CO₂ wurden die Kolonien ausgezählt und die CFU/ml bestimmt.

5.7.5. Infektionen in „Human Lung Tissue Explants“ (HLTEs)

Zur Bestimmung der Pathogenität der *L. pneumophila* Corby Mutanten in humanem Lungengewebe wurden Infektion von HLTEs durchgeführt (siehe Jäger *et al.*, 2014). Das explantierte, humane Lungengewebe stammte von Krebspatienten, denen aufgrund eines Lungenkarzinoms ein Teil der Lunge entnommen wurde. Das Gewebe wurde unfixiert aus der Pathologie des Klinikums Braunschweig erhalten. Hier wurde zuvor das enthaltene Tumorgewebe zur weiteren Untersuchung entnommen. Für experimentelle Zwecke wurde ein tumorfreies Stück vom Rand des entnommen Lungengewebes eingesetzt. Das gesunde Lungengewebe wurde mit einem Skalpell in kleine Stücke mit einem Gewicht von 0,1 g geschnitten und mit einer Pinzette in Lungenmedium überführt (siehe Tabelle 5.18).

Tabelle 5.18: Zusammensetzung des zur Infektion von HLTEs Mediums
Lungeninfektionsmedium

500 ml	RPMI 1640
50 ml	hitzeinaktiviertes FCS
5 ml	200 mM L-Glutamin
10 ml	1 M HEPES
5 ml	100mM Na-Pyrovat

Für die Infektion wurden stationäre *L. pneumophila* Corby Kulturen mit sterilem 1 x PBS von der BCYE-Agarplatte abgespült und auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml in Lungeninfektionsmedium eingestellt. Anschließend wurden 2 ml der Suspension in das jeweilige Well einer 24-Well-Platte aliquotiert und das geschnittene Lungengewebe darin infiziert. Die Infektion erfolgte über 48 h nach jeweils 2 h, 24 h und 48 h der Infektion wurde die CFU pro Gramm Gewebe bestimmt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Gewebeproben mit einer sterilen Pinzette aus der Bakteriensuspension entnommen und in ein 13 ml Röhrchen mit 3 ml sterilem H₂O_{bidest.} überführt. Diese Röhrchen wurden gewogen, um das Gewicht des Gewebes zu bestimmen und mit dem Ultra-Turrax homogenizer (IKA) homogenisiert. Im Anschluss wurden verschiedene Verdünnungsstufen auf BCYE-Agar ausplattiert und für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert.

5.7.6. Invasionsassay in *D. discoideum*

Zur Untersuchung des Einflusses der *L. pneumophila* Corby Mutanten auf die Internalisierung durch *D. discoideum* wurden 5×10^5 /Well adhärenzte *D. discoideum* Zellen mit einer MOI von 10 infiziert. Dies entspricht 5×10^6 Bakterien/ml in jeweils 500 µl Infektionsmedium. Hierzu wurden die stationären *L. pneumophila* Stämme nach 3-4 tägiger Kultivierung von den BCYE-Agarplatten mit 1x PBS abgespült und mittels OD_{600nm} Messung die Keimzahl bestimmt. Die Infektion erfolgte in 24-Well-Platten. Im Anschluss wurde der Infektionsansatz durch Zentrifugation für 5 min bei 300 g synchronisiert und dann für 1 h bei 25 °C inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit, wurden die Zellen zweimal mit 1x Soerensenpuffer gewaschen. Um alle nicht phagozytierten, extrazellulären Bakterien abzutöten, erfolgte eine einstündige Inkubation mit 100 µg/ml Gentamycin im Infektionsmedium. Nach der Gentamicin-Behandlung werden die Zellen zweimal mit 1x Soerensenpuffer gewaschen. Im Anschluss wurden *D. discoideum* Zellen mit 1 ml $H_2O_{bidest.}$ aufgenommen, und mit einer Pipettenspitze von der Platte gekratzt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Wirtszellen aufzuschließen, werden diese für 7 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und anschließend auf höchster Stufe gevortext. Von der Suspension mit den freien Bakterien wurden in einer 96-Well-Platte mit $H_2O_{bidest.}$ entsprechende 1:10 Verdünnungen erstellt und jeweils 20 µl auf BCYE-Platten ausplattiert. Das für die Infektion eingesetzte Inokulum wurde für spätere Berechnungen der Invasionsrate ebenfalls verdünnt und auf BCYE-Platten ausplattiert. Nach 3-4 tägiger Inkubation der Platten bei 37 °C, 5 % CO_2 wurden die Kolonien ausgezählt und die CFU/ml bestimmt. Anhand der Zellzahl des Inokulums wurde anschließend die Invasionseffizienz berechnet und mit dem *L. pneumophila* Corby Wildtyp verglichen.

5.7.7. Adhäsions- und Invasionsassay in A549 Epithelzellen

Zur Untersuchung der Adhäsions- und Invasionseffizienz der *L. pneumophila* Corby Mutanten in humanen Zellen wurden unter anderem Experimente mit A549 Epithelzellen durchgeführt. Hierzu wurden 5×10^5 Zellen/Well konfluente A549 Zellen jeweils mit einer MOI von 100 infiziert. Dazu wurden die stationären *L. pneumophila* Stämme von den BCYE-Agarplatten mit 1 x PBS abgespült. Mittels OD_{600nm} Messung wurde die Keimzahl auf 1×10^8 Bakterien/ml in DMEM Medium eingestellt und mit jeweils 500 µl der Suspension infiziert. Für den Adhäsionsassay wurden die A549 Zellen zuvor für 1 Stunde mit 10 µM Cytochalasin B in DMEM Medium behandelt. Cytochalasin B blockiert die Polymerisation des Aktinzytoskelettes und hemmt somit die Internalisierung der Bakterien in die Zelle. Nach 1 Stunde Infektion bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen, um die nicht adhärenzten Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die A549 Zellen mit 0,01 % Triton-X-100 abgelöst und lysiert.

Die Inkubationszeit des Invasionsassays betrug 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen und die verbliebenen extrazellulären Bakterien durch eine Behandlung mit 100 µg/ml Gentamicin im DMEM Medium für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ abgetötet. Das Gentamicin wurde durch zweimaliges Waschen mit 1 x PBS entfernt und die Zellen mit 0,01 % Triton-X-100 lysiert. Von den Suspensionen wurden in einer 96-Well-Platte mit H₂O_{bidest.} entsprechende 1:10 Verdünnungen erstellt und jeweils 20 µl auf BCYE-Platten ausplattiert. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ werden die Kolonien ausgezählt und die CFU/ml bestimmt. Anhand der CFU des Inokulums wurde anschließend die Adhäsions- und Invasionseffizienz berechnet und mit dem *L. pneumophila* Corby Wildtyp verglichen.

5.7.8. Adhäsions- und Invasionsassay in THP-1 Makrophagen

Zur Untersuchung der Adhäsions- und Invasionseffizienz der *L. pneumophila* Corby Mutanten in THP-1 Makrophagen wurden jeweils 1 x 10⁵ Makrophagen mit einer MOI von 20 infiziert. Im Vorfeld wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und für 48 h in RPMI Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ ausdifferenziert (siehe 5.6.7). Für die Infektion wurden stationäre *L. pneumophila* Corby Kulturen mit sterilem 1 x PBS von der BCYE-Agarplatte abgespült, auf eine Zellzahl von 2 x 10⁷ Bakterien/ml in RPMI Medium eingestellt und 100 µl zu den Zellen gegeben. Für den Adhäsionsassay wurde die Phagozytose der Bakterien durch eine einstündige Inkubation der THP-1 Zellen mit 10 µM Cytochalasin B in RPMI Medium gehemmt. Die Bakterien adhärten 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen, um die nicht adhärenen Bakterien zu entfernen. Anschließend wurden die THP-1 Zellen mit 0,01 % Triton-X-100 abgelöst und lysiert. Für den Invasionsassays wurden die Makrophagen für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ infiziert. Um die verbliebenen nicht phagozytierten Bakterien zu entfernen wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen mit 100 µg/ml Gentamicin im RPMI Medium für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ behandelt. Die Zellen wurden erneut zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit 0,01 % Triton-X-100 lysiert. Durch 1:10 Verdünnungen der Bakterien Suspension in einer 96-Well-Platte mit H₂O_{bidest.} und das Ausplattieren auf BCYE-Platten, konnte nach 3-4 Tagen Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ die CFU/ml bestimmt werden. Anhand der CFU des Inokulums wurde ebenfalls die Adhäsions- und Invasionseffizienz berechnet und mit dem *L. pneumophila* Corby Wildtyp verglichen.

5.7.9. Quantifizierung der Adhäsion und Invasion in THP-1 Makrophagen

Die Adhäsions- und Invasionseffizienz der *L. pneumophila* Corby Mutanten wurde zusätzlich durch differenzielle Immunfluoreszenzmikroskopie quantifiziert (siehe Hilbi *et al.*, 2001 und Newton *et al.*, 2008). Im Vorfeld wurden THP-1 Makrophagen auf eine Konzentration von 2 x 10⁵ Zellen/ml in RPMI Medium eingestellt und jeweils 500 µl in die

vorbereiteten 24-Well Platten ausgesät, in die je ein steriles Deckgläschen pro Well platziert wurde. Die Makrophagen wurden anschließend für 48 h ausdifferenziert (siehe 5.6.7). Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 50. Hierzu wurden stationäre *L. pneumophila* Corby Kulturen mit sterilem 1 x PBS von der BCYE-Agarplatte ab gespült, auf eine Zellzahl von 2×10^7 Bakterien/ml in RPMI Medium eingestellt und mit 200 µl infiziert. Die Inkubation für die Adhäsion betrug 30 min und für die Invasion 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen und über Nacht mit 3 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C fixiert.

Die differenzielle Immunfluoreszenzfärbung erfolgte indem die Deckgläser jeweils mit der Zellseite nach unten in Tropfen der Lösung auf Parafilm inkubiert wurden. Zunächst wurden die Präparate zweimal mit 1 x PBS gewaschen und für 20 min in 1 x PBS mit 10 % FCS geblockt. Anschließend wurden die Deckgläser mit 20 µl des 1:100 verdünnten rabbit anti-*L. pneumophila* Antikörpers für 20 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit 1 x PBS, erfolgte eine Inkubation mit dem 1:200 verdünnten Alexa Fluor 488 gekoppelten goat anti-rabbit IgG Sekundärantikörper für 20 min bei RT im Dunkeln. Die Deckgläser wurden erneut dreimal mit 1 x PBS gewaschen und für 10 min mit 0,1 % Triton-X-100 in 1 x PBS permeabilisiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 1 x PBS erfolgte die erneute Inkubation mit 20 µl des 1:100 verdünnten rabbit anti-*L. pneumophila* Antikörpers für 20 min bei RT. Darauf folgend wurden die Präparate zweimal mit 1 x PBS gewaschen und für 20 min bei RT im Dunkeln mit dem 1:200 verdünnten Alexa Fluor 568 gekoppelten goat anti-rabbit IgG Sekundärantikörper inkubiert. Zum Schluss wurden die Deckgläser zweimal mit 1 x PBS gewaschen und mit der Zellseite nach unten mit DAKO Mountingmedium auf Objektträgern fixiert. Auf diese Weisen wurden die extrazellulären Bakterien in grün/gelb und die intrazellulären Bakterien in rot differenziell gefärbt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop. Es wurden die internalisierten und adhärenen Bakterien von 100 Makrophagen aus jeweils drei unabhängigen Experimenten ausgezählt und die Anzahl der adhärenen und internalisierten Bakterien pro Zelle bestimmt.

5.8. Molekularbiologische Methoden

5.8.1. Isolierung genomischer DNA

Die Isolation der bakteriellen genomischen DNA von *L. pneumophila* erfolgte durch Phenol-Chloroform-Fällung. Dazu wurden *L. pneumophila* Corby Kulturen mit sterilem H₂O_{bidest} von BCYE-Agarplatten ab gespült und 2 ml dieser Suspension für 3 min bei 18.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml TNE-Lösung resuspendiert und erneut für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die

Zellen in 600 µL Lysisbuffer aufgeschlossen. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37 °C. Durch Zugabe von 30 µL Proteinase K wurden die Proteine der Zelle degradiert. Die Inkubation erfolgte für 1,5 Stunden bei 65 °C, dem Temperaturoptimum der Proteinase und anschließend für 30 min bei 60 °C, um einen optimalen Abbau der RNA zu gewährleisten. Anschließend wurden 500 µL Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1, v/v) zur Lösung gegeben und für 15 min bei RT und 1000 rpm schüttelnd inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 10 min bei 16.000 g wurde die DNA in der oberen wässrigen Phase gelöst. Die Proteine befanden sich in der Interphase. Aus der wässrigen Phase wurden 400 µL entnommen und in ein neues 2 ml Reagiergefäß überführt. Die Fällung der chromosomalen DNA erfolgte durch die Zugabe von 200 µL 5 M NaCl-Lösung und 1300 µL absolutem Ethanol. Nach dreimaligem Invertieren wurde die DNA durch eine Zentrifugation bei 16.000 g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 1 ml 70 %igem Ethanol und nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g. Die abschließende Zentrifugation für 5 min bei 16.000 g erfolgte mit absolutem Ethanol. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet bei RT getrocknet und die DNA anschließend in 150 µL H₂O über Nacht gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, mittels Nanodrop-Spektrophotometer (siehe 5.8.2). Die Reinheit der DNA wurde über die Quotienten der Wellenlängen 260:280 und 260:230 bestimmt. Die Integrität der DNA wurde zusätzlich in einem 1 %igen Agarosegel überprüft (siehe 5.8.3). Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 5.19 aufgeführt.

Tabelle 5.19: Zusammensetzung der zur DNA-Isolierung verwendeten Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
Proteinase K-Stock	20 mg/ml
RNase A-Stock	10 mg/ml
TNE	100 mM Tris-HCL, pH 8,0 10 mM NaCl 10 mM EDTA, pH 8,0
TNEX	TNE und 1 % Triton
Lysisbuffer	555 µl TNEX 15 µl Lysozym 30 µl RNase A
Lysozym-Stock	20 mg/ml

5.8.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA oder Plasmiden erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm von 1 µl der DNA-Probe am Nanodrop-Spektrophotometer. Eine Extinktion von 1 wurde dabei einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA erreicht. Die Reinheit der Lösung ergab sich aus dem Quotienten der Extinktionen,

die bei 260 nm und 280 nm gemessen wurden und sollte 1,8-2 betragen. Die Konzentration von PCR Produkten oder anderen DNA Fragmenten wurde durch den Abgleich mit einem definierten Größenstandard, nach der Auftrennung in einem 1 %igen Agarosegel ermittelt (siehe 5.3.1 und 5.8.3).

5.8.3. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Länge und der Konformität der DNA abhängig. Zur Agarosegelelektrophorese von DNA wurde diese im Verhältnis (1:6 (v/v)) mit Probenpuffer (6x) vermischt und auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Anschließend wurde ein elektrisches Feld angelegt. Bei einer Einstellung der Stromquelle auf 75 V, 120 mA und mit einer Laufdauer von 60 min ließen sich DNA-Fragmente von 0,5 kb bis 7 kb in einem 1 %igen Gel trennen. Die für die Agarosegelelektrophorese benötigten Lösungen sind in Tabelle 5.20 aufgeführt.

Tabelle 5.20: Zusammensetzung der zur Agarosegelelektrophorese verwendeten Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
Agarosegel	1 % Agarose in 1 x TAE
50x TAE	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8.0 Mit H ₂ O _{bidest.} auf 1000 ml auffüllen
6x Ladepuffer	350 µM Bromphenolblau 450 µM Xylencyanol FF 50% Glycerin (v/v)

Nach Färbung mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (1 µg/ml in dH₂O) konnte die DNA spezifisch durch Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 312$ nm visualisiert und über eine Geldokumentationsanlage digitalisiert werden. Ein DNA Größenstandard diente zum Größenvergleich sowie zur Identifizierung der DNA Fragmente (siehe 5.3.1).

5.8.4. PCR

Das allgemeine Prinzip einer PCR besteht in der zyklischen Amplifikation von DNA Sequenzen durch eine hitzebeständige DNA-Polymerase. Der zu amplifizierende DNA Abschnitt, die Template-DNA, wird von zwei Oligonukleotiden, den Primern, mit einer Länge von ca. 20-30 bp definiert. Jeder Zyklus besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, dem Anlagern (Annealing) der Primerpaare an jeweils ein Ende des DNA-Strangs in gegenläufiger Richtung und der Synthese eines komplementären DNA-Moleküls an beiden Strängen (Extension) durch die DNA-Polymerase. Mittels der

PCR lassen sich nicht nur spezifische DNA-Sequenzen amplifizieren, sondern es ist auch eine Analyse von DNA-Sequenzen für die Mutagenese möglich.

PCR zur Amplifikation von Genen oder spezifischen DNA Abschnitten

Die Amplifikation von Genen oder spezifischen DNA Abschnitten zur Mutagenese erfolgte mit einer DNA Polymerase mit 3' → 5' Exonuklease Aktivität, um die Entstehung von Punktmutation während der Amplifikation zu vermeiden.

Tabelle 5.21: PCR-Ansatz zur Amplifikation von Genen oder spezifischen DNA Abschnitten
Ansatz für eine 100 µl PCR-Reaktion mit Q5® Polymerase

20 µl	5 x Q5® Reaktion-Buffer
2 µl	10 mM dNTPs
2,5 µl	10 µM forward Primer
2,5 µl	10 µM reverse Primer
1 µl	chromosomale DNA von <i>L. pneumophila</i> Corby
1 µl	Q5® High-Fidelity DNA Polymerase
71 µl	MilliQ

PCR Programm

Deckel vorheizen auf 110 °C

98 °C	30 sek	
98 °C	10 sek	} x35
60-67 °C	15 sek	
72 °C	20 sek/kb	
72 °C	2 min	
4 °C	Pause	

Kolonie PCR zur Überprüfung von Mutagenese Schritten

Zur Überprüfung der Insertion der DNA Fragmente in den entsprechenden Vektor nach der *E. coli*-Transformation, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Das Pipettierschema für die Kolonie PCR sowie das PCR Programm sind der Tabelle 5.22 zu entnehmen.

Tabelle 5.22: Kolonie PCR-Ansatz zur Überprüfung von Mutagenese Schritten
Ansatz für eine 25 µl PCR-Reaktion mit LongAmp® Taq-Polymerase

3 µl	LongAmp Taq Reaction Buffer
0,5 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	10 µM forward Primer
0,5 µl	10 µM reverse Primer
0,25 µl	LongAmp® Taq DNA Polymerase
10,25 µl	MilliQ

PCR Programm

Deckel vorheizen auf 110 °C

94 °C	30 sek	
94 °C	30 sek	} x30
42-60 °C	30 sek	
65 °C	50 sek/kb	
65 °C	3 min	
4 °C	Pause	

Für die Kolonie PCR wurde mit einer sterilen Pipettenspitze etwas Bakterienmaterial von der Kolonie abgenommen und direkt in den jeweiligen PCR Ansatz übertragen. Durch einen verlängerten Denaturierungsschritt in der PCR Reaktion wurden die Bakterienzellen lysiert und die DNA freigesetzt, diese diente dann als Template für die Amplifikation des inserierten DNA Fragments. Auf diese Weise konnten die positiven Klone aus der Transformation identifiziert werden.

5.8.5. Sequenzierung

Durch Mutagenese veränderte DNA Abschnitte wurde durch eine anschließende Sequenzierung überprüft. Zur Sequenzierung wurden mittels PCR generierte DNA-Fragmente oder Plasmide sowie die notwendigen Primer der Firma GATC zugesandt. Hinsichtlich der Reinheit und Konzentration der Proben wurden die Anforderungen der Firma GATC umgesetzt. Nach Abschluss der Sequenzierung wurden die erhaltenen Sequenzen durch ein Alignment mit der *pilY1* Sequenz unter Zuhilfenahme der Programme Vector NTI Advance 10 und NCBI BLAST® auf Mutationen überprüft.

5.8.6. Herstellung von *pilY1* *L. pneumophila* Deletionskonstrukten

Die Herstellung der *L. pneumophila pilY1* Deletionsmutante erfolgte über homologe Rekombination des Gens *ntpl*. Dafür wurde ein Deletionskonstrukt nach dem Protokoll von Derbise *et al.*, 2003 und Sexton and Vogel, 2004 mit Hilfe der PCR hergestellt. Dieses Protokoll beinhaltet drei PCR separate Amplifikationen. Im ersten Schritt erfolgte die unabhängige Amplifikation der 1 kb großen flankierenden Sequenzen jeweils up- und downstream (1491/1541 bp) des *pilY1* Gens. Hierzu wurden die Primer PilY1up F/R und PilY1down F/R verwendet. Im zweiten Schritt wurde das Kanamycin-Resistenzgen *ntpl* (850 bp) mit den Primern Kmfull F/R amplifiziert. Alle erhaltenen PCR Fragmente wurden im Anschluss durch eine Gelextraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Im letzten PCR-Schritt wurden alle drei PCR Produkte in äquimolaren Konzentrationen als Template eingesetzt und mit den Primern PilYup F und PilYdown R zu einem DNA Fragment zusammengefügt. Dies wurde durch den jeweiligen Überhang 3'-Ende der Up- und Down-Fragmente sichergestellt, welcher an den 5'-Bereich

des Kanamycin-Resistenzgens bindet. Diese Sequenzen wurden mit den Primern PilYup R und PilYdown F angefügt. Das erhaltene PCR Fragment wurde mittels Gelextraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Hersteller Angaben auf gereinigt.

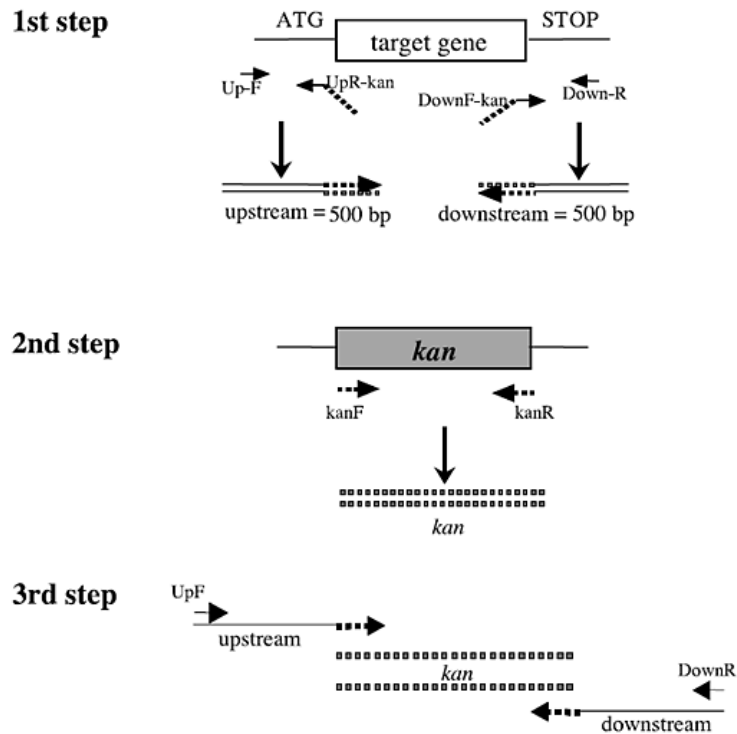


Abbildung 5.2: Prinzip zur Herstellung von Deletionskonstrukten zur Mutagenese mittels homologer Rekombination. Die ersten beiden Schritte beinhalteten die getrennte Amplifikation der up- und downstream Sequenzen sowie der Kanamycin-Kassette. Wobei die Primer UpR und DownF über 3' Überhänge homolog zu den Primern KanF/R verfügen. Im dritten und letzten Schritt wurden die drei Fragmente mittels PCR zusammengefügt (modifiziert nach Derbise *et al.*, 2003).

Für die weitere Klonierung wurde dem PCR Fragment am 5'Ende mit einem Adenosin versehen, indem es für 20 min bei 70 °C mit der Taq-Polymerase in Gegenwart von dATP inkubiert wurde (siehe Tabelle 5.23). Anschließend wurde das *pilY1* Deletionskonstrukt in den pGEM®-T easy Vektor kloniert. Die Ligation erfolgte über die AT Überhänge und wurde mit dem den pGEM®-T easy Kit nach Herstellerangaben bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Der komplette Ligationsansatz wurde in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH10β transformiert (siehe 5.8.7). Positive Klone wurden mittels Ampicillin und Blau-Weiß-Selektion identifiziert und durch eine Kolonie PCR mit den Primern SP6 und T7 überprüft. Klone mit dem *pilY1* Deletionskonstrukt wurden in 6 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht bei 200 rpm und 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden das Plasmid pGEM®-T *pilY1::nptI* mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Sequenz der flankierenden Sequenzen wurde durch Sequenzierung mit den Primern SP6 und T7 überprüft.

Tabelle 5.23: Ansatz für die Adenosin-Addition zur Klonierung pGEM®-T easy

Ansatz für die Adenosin-Addition

5 µl	2 mM dATP
0,2 µl	Taq-Polymerase
5 µl	10 x Thermopol-Puffer
40 µl	DNA

5.8.7. Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden die jeweiligen Ligationsansätze mit 50 µl der kompetenten *E. coli* Zellen vermischt. Es folgte eine Inkubation für 20 min auf Eis. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C durchgeführt und die Zellen sofort auf Eis überführt. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 300 rpm und 37 °C inkubiert (siehe Tabelle 5.12). Die transformierten Kulturen wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von Antibiotikum konnten die Bakterien, die das transformierte Plasmid enthielten, selektiert werden. Durch die Zugabe von IPTG und X-Gal konnte bei Vektoren, welche das α -Fragment der β -Galactosidase enthielten, zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden. Die durch IPTG induzierte Expression der β -Galaktosidase führte zur Blaufärbung der Kolonien durch die Spaltung von X-Gal in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo und Galaktose. Eine Integration des Inserts in die „Multiple Cloning Site“ des Plasmids, führte zur Unterbrechung des *lacZ*-Gens, welches für die β -Galaktosidase codiert, und konnte anhand der farblosen Kolonien identifiziert werden.

5.8.8. Mutagenese des *L. pneumophila pilY1* Gens

Die Deletion des *pilY1* Genes von *L. pneumophila* Corby erfolgte durch natürliche Transformation nach Sexton and Vogel, 2004 und Schunder *et al.*, 2010. Zunächst wurde ein *pilY1* Deletionskonstrukt aus dem Plasmid pGEM®-T *pilY1::nptI* mittels PCR amplifiziert und das erhaltene PCR Produkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und aufkonzentriert. Außerdem wurde eine *L. pneumophila* Corby Kultur in 25 ml YEB angesetzt und bei 30 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 kultiviert. Davon wurde 1 ml in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß aliquotiert und 2-4 µg des aufgereinigten PCR-Produktes hinzugefügt. Der Ansatz wurde 3 Tage stehend bei 30 °C inkubiert und anschließend auf BCYE-Platten ausplattiert. Diese wurden zuvor mit 12,5 µg/ml Kanamycin versetzt, welches durch Ausspateln auf die Platte aufgebracht wurde. Nach 4-5 Tagen waren bei erfolgreicher Transformation Kolonien zu beobachten. Diese wurden durch eine Kolonie-PCR mit den Primern PilYconf F/R überprüft. Die Primer binden außerhalb der zur Rekombination genutzten flankierenden Sequenzen. So ließ sich

nicht nur die Deletion des *pilY1* Gens sondern auch die richtige Insertionsposition bestätigen.

5.8.9. Komplementation des *L. pneumophila pilY1* Gens

Zur Komplementation der *pilY1* Deletionsmutante wurden Komplementationskonstrukte zur Expression des nativen PilY1 (WT PilY1) erstellt sowie der verkürzten Formen, mit einer Deletion der vWFa Domäne (Δ vWFa; Δ 1792-3506 bp) oder der PilY-Domäne (Δ PilYdom; Δ 1212-1793 bp). Hierzu wurde das komplette *pilY1* sowie die *pilY1* Fragmente mittels PCR und den Primern PilYcom F/R und PilY1vWF F, PilYdom R sowie PilY-vWF R amplifiziert. Zur Deletion der vWFa Domäne wurde der N-Terminus von PilY1 mit der PilY-Domäne in einem zweiten PCR Schritt fusioniert (siehe 5.8.6).

Tabelle 5.24: Ansatz des Restriktionsverdaus von pXDC61

Ansatz für einen Restriktionsverdau mit *XbaI* und *EcoRI* und Dephosphorylierung

33 μ l	MilliQ
5 μ l	10x CutSmart Puffer
1 μ l	<i>XbaI</i>
1 μ l	<i>EcoRI</i>
10 μ l	Vektor pXDC
5 μ l	Antarctic Phosphatase Puffer
1 μ l	Antarctic Phosphatase

Tabelle 5.25: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Klonierung in pXDC

Ansatz für einen Restriktionsverdau mit *XbaI* und *EcoRI*

13 μ l	MilliQ
5 μ l	10x CutSmart Puffer
1 μ l	<i>XbaI</i>
1 μ l	<i>EcoRI</i>
30 μ l	PCR Produkt

Die erhaltenen PCR Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und aufkonzentriert. Anschließend wurden die PilY1 Konstrukte sowie der Vektor pXDC61 mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *EcoRI* für 1 h bei 37 °C verdaut. Die Restriktionsansätze wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Der Vektor pXDC61 wurde zusätzlich mit Hilfe einer Phosphatase für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert und mittels Gelextraktion durch die Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits von dem verdauten BlaM Gen isoliert.

Anschließend wurden Vektor und die PilY1 Konstrukte im Verhältnis 1:3 mit Hilfe des Rapid Ligation Kit nach Hersteller Angaben ligiert. Die ligierten Plasmide wurden wie im Kapitel

5.8.7 beschrieben in *E. coli* DH10 β transformiert und die Transformanten über Nacht bei 37 °C auf LB Agarplatten mit 20 μ g/ml Chloramphenicol kultiviert.

Nach erfolgreicher Identifizierung der positiven Klone mittels Kolonie-PCR wurden diese in 6 ml LB Medium mit 20 μ g/ml Chloramphenicol über Nacht bei 200 rpm und 37 °C kultiviert und die Plasmid DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt. Die Sequenz der Komplementationskonstrukte wurde durch Sequenzierung mit den Primern pXDC61 F/R sowie PilY1seq I-III überprüft. Der Stamm *L. pneumophila* Corby Δ pilY1 wurde anschließend durch Elektroporation mit den Plasmiden pXDC WTPilY1, pXDC Δ pilY1dom und pXDC Δ vWFa transformiert (siehe 5.5.4).

5.8.10. Klonierung des *pilY1* Gens zur rekombinanten Proteinproduktion

Zur rekombinanten Produktion von PilY1 aus *L. pneumophila* wurde das Gen in verschiedene Produktionsplasmide kloniert um eine Überproduktion des Proteins sowie eine anschließende Aufreinigung über Affinitätstags zu ermöglichen.

Klonierung der PilY-Domäne für Ca²⁺-Bindungsanalysen

Zur Expression der PilY-Domäne wurden die Basenpaare 1764-3506 bp des *pilY1* Gens mit den Primern PilY dom-pvp F/R amplifiziert. Dieses Fragment wurde zunächst nach einer Adenosin Addition in den Vektor pGEM®-T easy ligiert (siehe 5.8.6 bzw. Tabelle 5.23). Der komplette Ligationsansatz wurde in CaCl₂-kompetente *E. coli* DH10 β transformiert (siehe 5.8.7). Positive Klone wurden mittels Ampicillin und Blau-Weiß-Selektion identifiziert und durch eine Kolonie PCR mit den Primern SP6 und T7 überprüft. Der Vektor pvp008 ZZ sowie pGEM®-T *pilY1*dom wurden anschließend aus einer *E. coli*-Kultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt. Anschließend wurden die Plasmide mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *HindIII* 1 h bei 37 °C verdaut. Gleichzeitig wurde der Vektor pvp008 ZZ dephosphoryliert (siehe Tabelle 5.26). Nach der Restriktion wurde der Vektor pvp008 ZZ mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die *pilY1* Domäne wurde mittels einer Gelextraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit auf dem pGEM®-T easy Vektor isoliert. Vektor und Insert wurden im Verhältnis 1:3 mit Hilfe des Rapid Ligation Kit nach Hersteller Angaben ligiert. Die ligierten Plasmide wurden wie im Kapitel 4.8.3 beschrieben in *E. coli* DH10 β transformiert und die Transformanten über Nacht bei 37 °C auf LB Agarplatten mit 20 μ g/ml Kanamycin kultiviert (siehe 5.8.7). Nach erfolgreicher Identifizierung der positiven Klone mittels Kolonie-PCR mit den Primern PilY dom-pvp F/R wurden diese in 6 ml LB Medium mit 20 μ g/ml Kanamycin über Nacht bei 200 rpm und 37 °C kultiviert und die Plasmid DNA mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit aufgereinigt. Die Sequenz des Expressionskonstrukts wurde durch Sequenzierung mit den Primern T7 Promotor und Terminator sowie PilY1seq II überprüft. Das korrekte pvp008 ZZ *pilY1*dom

Konstrukt wurde von Claudia Hanco vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta-gami 2 transformiert.

Tabelle 5.26: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Klonierung der PilY-Domäne in pvp008 ZZ
Ansatz für einen Restriktionsverdau mit *NotI* und *HindIII* und Dephosphorylierung

13 µl	MilliQ
5 µl	10x CutSmart Puffer
1 µl	<i>NotI</i>
1 µl	<i>HindIII</i>
30 µl	Vektor
5 µl	Antarctic Phosphatase Puffer
1 µl	Antarctic Phosphatase

5.9. Biochemische Methoden

5.9.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde anhand der Proteinbestimmung nach Bradford mittels des Reagenz Roti[®]-Nanoquant, nach den Angaben des Herstellers, bestimmt. Dazu wurden jeweils 800 µl der 1:5 in H₂O_{bides.} verdünnten Roti[®]-Nanoquant-Stammlösung mit 200 µl einer in entsprechendem Puffer verdünnten Proteinlösung vermischt und anschließend der Quotient OD_{590/450 nm} bestimmt. Die Konzentration konnte dann im Bezug auf eine BSA-Kalibrierreihe ermittelt werden.

5.9.2. Isolation von Proteinen aus dem Kulturüberstand durch TCA Präzipitation

Zur Analyse der von *L. pneumophila* Corby sezernierten Proteine wurde eine Präzipitation der Kulturüberstände mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Hierzu wurden der Wildtyp und die *ply1* negative Transposonmutante D1 aus einer stationären Vorkultur in 300 ml YEB-Medium auf eine OD_{600 nm} von 0,2 beimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu inkubiert. Nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Kulturen entnommen und bei 5000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Kulturüberstände wurden mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert, um alle verbliebenen Bakterien aus dem Überstand zu entfernen. Die Proteine des Kulturüberstands wurden anschließend mit 10 % Trichloressigsäure Endkonzentration über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Pelletierung der Proteine erfolgte durch Zentrifugation bei 8000 g und 4 °C für 1 h. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem Ethanol resuspendiert, erneut bei 1000 g und 4 °C für 15 min pelltiert und der Ethanol abgenommen. Anschließend wurden alle Pellets eines Stammes in insgesamt 10 ml eiskaltem, absolutem Ethanol resuspendiert und erneut für 20 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem Ethanol abs. resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine wurden erneut bei 12.000 g und 4 °C

pelletiert. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Abschließend wurden die Proteine einmal mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen und über Nacht bei 4 °C getrocknet. Die Proteine wurden während der gesamten Präparation auf Eis oder bei 4 °C gelagert, um eine mögliche Degradation durch Proteasen zu minimieren.

5.9.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE werden Proteine in einem Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Vor der Elektrophorese werden die Proteine mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert (siehe Tabelle 5.28). SDS ist ein anionisches Detergenz, welches die Eigenladung von Proteinen maskiert und eine Denaturierung der Proteine bewirkt. Diese Vorinkubation schafft die Voraussetzung für die Molekulargewichtsabschätzung und stellt sicher, dass die Migration der Proteine im Gel nur von ihrer Größe abhängt. Die Trennung von Proteinlysaten erfolgte mit 7 x 10 cm großen Gelen mit einem 6 %igen Sammelgel und einem 8-12 %igen Trenngel (siehe Tabelle 5.27). Wobei für Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-50 kDa standartmäßig 12 %ige Gele verwendet wurden. Die Analyse des 120 kDa großen Proteins PilY1 erfolgte hingegen mit 8 %igen SDS-Gelen. Für die SDS PAGE zur Westenblot Analyse wurden standartmäßig 20-50 µg der Zelllysate und der Proteinstandard „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ auf das Gel aufgetragen und bei 45 mA ca. 50-60 min aufgetrennt. Hierfür wurde die Gelappatur Mini-Protean Tetra von BioRad verwendet, diese wurde nach Herstellerangaben mit 1x SDS Laufpuffer gefüllt. Die zur SDS-PAGE verwendeten Puffer sind in Tabelle 5.28 aufgelistet.

Tabelle 5.27: Zusammensetzung der erstellten SDS-Polyacrylamidgele

Reagenz	Sammelgel	Trenngel	
		12 %	8 %
Acrylamidlösung (30 %)	830 µl	8,0 ml	1,7 ml
Tris-HCl (1,5 M; pH 8,8)		5,0 ml	1,3 ml
Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)	1,3 ml		
H ₂ O _{bidest.}	2,9 ml	6,8 ml	2,0 ml
TEMED	5 µl	8 µl	2 µl
APS (10 %)	50 µl	200 µl	50 µl

Tabelle 5.28: Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Puffer und Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
4x SDS-Ladepuffer	30 ml Glycerin 15 ml Mercaptoethanol 10 g SDS 0,2 g Bromphenolblau

Reagenz	Zusammensetzung
10x SDS-Laufpuffer	60,6 g Tris-Base 288 g Glycin 20 g SDS

5.9.4. Coomassie Färbung von SDS Gelen

Eine Protein-Nachweismethode in SDS Gelen ist die Coomassie Färbung. Hierbei bindet der Coomassie Brilliant Blue Farbstoff unspezifisch an kationische Aminosäuren über ionische Wechselwirkungen. Zur Färbung wurde das SDS Gel für mehrere Stunden bzw. über Nacht in der Coomassie Färbelösung gefärbt. Das gefärbte Gel wurde anschließend mehrfach in Entfärbelösung entfärbt, bis die Hintergrundfärbung verschwunden war. Das Gel wurde in Einmachfolie konserviert. Eine weitere und schnellere Färbung erfolgte mit Coomassie Silver-Blue, da hier nur eine sehr geringe Hintergrundfärbung des Gels auftritt. Die Zusammensetzungen der jeweiligen Lösungen sind in Tabelle 5.29 angegeben.

Tabelle 5.29: Zusammensetzung der für die Coomassie Färbung verwendeten Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
Comassiefärbelösung	100 ml Essigsäure 500 ml Ethanol 1 g Coomassie Brilliant Blue G250 mit H ₂ O _{bidest} auf 1000 ml auffüllen
Entfärbelösung	300 ml Ethanol 100 ml Essigsäure mit H ₂ O _{bidest} auf 1000 ml auffüllen
Coomassie Silver-Blue	100 g Ammoniumsulfat 100 ml o-Phosphorsäure 1,2 g Coomassie Brilliant Blue G 250 mit H ₂ O _{bidest} auf 1000 ml auffüllen 20 % Methanol oder Ethanol vor Verwendung frisch dazugeben

5.9.5. Identifikation von Proteinen des Sekretoms mittels 2D-Gelelektrophorese

Zum Vergleich des Sekretoms des *L. pneumophila* Corby WT und der *pilY1* negativen Transposonmutante *L. pneumophila* Corby D1, wurden die Proteine des Kulturüberstands mittels TCA Präzipitation isoliert (siehe 5.9.2). Zur statistischen Auswertung wurden pro Stamm jeweils drei unabhängige Kulturen analysiert. Nach der Fällung wurden die Proteine in 200 µl Rehydratisierungspuffer A resuspendiert und die Konzentration der Proteinlösung mit Roti-Nanoquant bestimmt (siehe 5.9.1). Die Qualität der Proben wurde mit einer SDS-PAGE untersucht und das Gel anschließend mit Coomassie Silver-Blue gefärbt. Im

nächsten Schritt folgte die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI-Wert) mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF). Hierzu wurden die Proben auf einer Konzentration von 100 µg Protein in einem Volumen von 200 µl mit Rehydratisierungspuffer A eingestellt. Anschließend wurden 100 µl von Rehydratisierungspuffer B hinzugegeben und die Proteinlösungen luftblasenfrei in die Vertiefungen der Rehydratisierungskammer pipettiert (siehe Tabelle 5.30).

Tabelle 5.30: Zusammensetzung der benötigten Puffer zur IEF

Reagenz	Zusammensetzung
Rehydratisierungspuffer A	7 M Harnstoff p.a. 2 M Thioharnstoff p.a. 4 % CHAPS (w/v) 50 mM DTT
Rehydratisierungspuffer B	2,625 ml Rehydratisierungspuffer A 125 µl Bio-Lyte® Ampholyte (pH 3-10); BIO RAD 163-1112 1 Spatelspitze Bromphenolblau

Zur isoelektrischen Fokussierung wurde ein nicht linearer pH Gradientenstreifen mit einem Bereich von pH 3-10 verwendet und ü.N. bei RT in der Proteinlösung äquilibriert. Dazu wurde der Streifen mit der Gel-beschichteten Seite nach unten luftblasenfrei auf die Proteinprobe in der Rehydratisierungskammer aufgelegt und mit Mineralöl, als Verdunstungsschutz, überschichtet. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit dem PROTEAN® iI2™ IEF System bei Raumtemperatur und einer maximalen Stromstärke von 50 µA pro Gelstreifen und wurde ab dem Erreichen von 60.000 Vh gestoppt. Der genaue Spannungsverlauf der isoelektrischen Fokussierung ist in Tabelle 5.31 angegeben.

Tabelle 5.31: Spannungsverlauf der isoelektrischen Fokussierung

Schritt	Spannung [V]	Zeit [h]	Übergang
1	250	1	schnell
2	500	1	schnell
3	1.000	1	schnell
4	5.000	22	schnell
5	500	99	schnell

Die äquilibrierten Gradientenstreifen wurden mit der Gel-seite nach unten in das PROTEAN® iI2™ IEF System gelegt. Das mit einem „+“ gekennzeichnete Ende des Streifens wurde dabei an der Anode des Fokussierungsgerätes angelegt. Der Streifen wurde anschließend mit 3 ml Mineralöl beschichtet. Nach der IEF wurden die Streifen in einer Kunststoffhülle bei -80 °C gelagert oder direkt für eine SDS-PAGE verwendet. Hierzu wurden die Streifen zunächst für 15 min in SDS-Equilibrierungspuffer mit DTT (150 µL 1 M DTT-Lösung pro

10 ml Puffer) inkubiert und anschließend in SDS- Equilibrierungspuffer mit Iodacetamid (250 mg Iodacetamid pro 10 ml Puffer) gewaschen (siehe Tabelle 5.32). Es wurden 3-5 ml Waschlösung pro Streifen benötigt.

Tabelle 5.32: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers zur 2D-Gelelektrophorese
SDS-Equilibrierungspuffer

10 ml	1 M Tris, pH 8.8
72,07 g	Urea p.a.
60 ml	100 % Glycerol (v/v)
40 ml	10 % SDS (w/v)
400 µl	1 % Bromphenolblau (w/v)
	mit MilliQ auf 200 ml auffüllen

In der zweiten Dimension wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Dazu wurden in einer Gießkammer jeweils Platzhalter und Glasplatten eingelegt und die Halterung verschlossen. Die 25 x 20.5 cm großen Gele wurden in dieser Gießkammer von unten nach oben gegossen. Nach dem auspolymerisieren der Gele wurden die Streifen der IEF luftblasenfrei auf das jeweilige SDS-Gel aufgelegt und mit Sealing Solution überschichtet (siehe Tabelle 5.33). Die Gele wurden in die Gelkammer überführt und die Laufkammer mit 28 l SDS-Laufpuffer gefüllt (siehe Tabelle 5.28). Die Auftrennung erfolgte bei 1-2 W pro Gel (ca. 18 h) bis der Bromphenolblau-Streifen den unteren Rand des Gels erreicht.

Tabelle 5.33: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele zur 2D-Gelelektrophorese

Reagenz	Zusammensetzung
SDS-Gellösung für 4 Gele	232 ml 30 % Acrylamid
	138 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8.8
	175 ml MilliQ
	5,5 ml 10 % SDS (w/v)
	3,0 ml 10 % APS (w/v)
	0,55 ml TEMED
Sealing Solution	1 % Agarose (w/v)
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	in 1 x SDS-Laufpuffer

Die Gele wurden aus der Kammer entnommen und für 1 h bei leichtem Schütteln mit Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, v/v) fixiert. Eine Färbung der Gele erfolgte mit dem fluoreszierenden Farbstoff Krypton. Dafür wurden die Gele zunächst 5 min mit $H_2O_{bidest.}$ gewaschen und anschließend mit Krypton-Färbelösung schwenkend ü.N. bei RT gefärbt. Im nächsten Schritt wurden die Gele für 15 min sowie für 30 min mit $H_2O_{bidest.}$ gewaschen und mit einem Typhoon Fluoreszenzscanner mit dem Emissionsfilter LP 560

Ge Puro bei 532 nm und einer Spannung von 400 und 425 PMT eingescannt. Anschließend wurden die mit ausreichend Wasser befeuchteten Gele in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit einem Schweißgerät konserviert. Die Analyse und Quantifizierung der Proteinspots wurde mit Delta 2D (Decodon) durchgeführt. Für die Identifizierung von Proteinspots wurden die Spots mit Hilfe eines Roboters ausgestanzt, mit Trypsin verdaut und massenspektroskopisch analysiert. Die Messung und Auswertung erfolgte durch Dr. Daniela Zühlke und Dr. Stephan Fuchs vom Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald.

5.9.6. Identifikation von Proteinen des Sekretoms mittels des Orbitrap™ Ionenfallen-Massenspektrometer

Die Sekretome des *L. pneumophila* Corby WT und der *pilY1* negativen Transposonmutante *L. pneumophila* Corby D1, wurden zusätzlich mit gelfreien Methoden analysiert. Für die Orbitrap Analysen wurden die gleichen Proben wie zur 2D-Gelelektrophorese verwendet. Hierfür wurde zunächst eine SDS-PAGE mit jeweils 20 µg Protein bei 45 mA pro Gel für ca. 45 min durchgeführt. Die SDS-Gele wurden für 1 h bei RT in Fixierlösung fixiert und ü.N. in Coomassie Silverblue gefärbt. Danach konnten die Gele mit Wasser entfärbt und dokumentiert werden. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine jeder Probe mit einem Skalpell in zehn Teile zerschnitten. Dabei sollte jedes Gelstück in etwa die gleiche Proteinmenge enthalten. Die einzelnen Gelstücke wurden zur Lagerung bei 4 °C in je ein Reaktionsgefäß überführt und mit MS-Wasser überschichtet. Für den in-Gel-Verdau der Proteine mussten die Gelstücke zunächst entfärbt werden. Dazu wurden jeweils 700 µl Gelwaschlösung hinzugegeben bei 37 °C und 900 rpm schüttelnd inkubiert, bis das Gelstück komplett entfärbt war (siehe Tabelle 5.34).

Tabelle 5.34: Zusammensetzung der Gelwaschlösung

Gelwaschlösung	
0,7906 g	NH ₄ HCO ₃
15 ml	Acetonitril-ultrapure (30 %)
35 ml	MilliQ
	3-4 d haltbar

Als nächstes wurde das Gelstück in einem Zentrifugal-Vakuumkonzentrator (SpeedVac®) bei 30 °C für 30 min unter Vakuum getrocknet. Zum Verdau der Proteine wurden jeweils 50 µl 1:10 verdünntes Trypsin hinzugegeben. Die Trypsinzugabe wurde in 10-20 µl Schritten wiederholt, bis keine weitere Flüssigkeit vom Gel aufgenommen wurde und der verbliebene Überstand verworfen. Die Gelstücke wurden anschließend ü.N. bei 37 °C verdaut. Die Elution der verdauten Peptide erfolgte durch die Zugabe von 20 µl MS-Wasser und eine Inkubation im Ultraschallbad für 15 min. Die komplette Lösung wurde nun in der

SpeedVac® bei 30 °C auf 3-10 µl eingengt und in ein Analysegefäß überführt um die Peptide mit der Orbitrap zu vermessen. Die Auswertung erfolgte durch Florian Bonn und Dr. Stephan Fuchs vom Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald.

5.9.7. Identifikation von Proteinen des Sekretoms mittels des Synapt Massenspektrometers

Die Sekretome des *L. pneumophila* Corby WT und der *pilY1* negativen Transposonmutante *L. pneumophila* Corby D1, wurden außerdem mit durch quantitative Messungen mit der Synapt analysiert. Für diese Messungen wurden die gleichen Proben wie zur 2D-Gelelektrophorese verwendet. Hierzu wurden die Proteine zunächst mit StrataClean Beads umgepuffert. Dazu wurden im ersten Schritt jeweils 100 µg Protein mit 50 mM Triethylammonium bicarbonat Puffer (TEAB) um den Faktor 5 verdünnt. Als Kontrolle für die Aufreinigung wurde jeder Verdauansatz mit 1 µg BSA versetzt. Jeweils 30 µl der StrataClean Beads Suspension wurden zweimal mit 200 µl 50 mM TEAB gewaschen und bei 10.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Die verdünnte Proteinlösung wurde mit den Beads vermischt und ü.N. bei 4 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 8.000 rpm für 3 min bei RT zentrifugiert und zweimal mit 200 µl 50 mM TEAB gewaschen. Dann wurden 1 µl 500 mM Tris(2-Carboxy-Ethyl)Phosphine Puffer (TCEP) (1 mg in 7 µl TEAB) zugegeben und der Ansatz für 30-45 min bei 60 °C leicht schüttelnd inkubiert. Wenn der Ansatz auf RT abgekühlt war, wurden 2 µl 500 mM Iodacetamid (1 mg in 10,8 µl TEAB) zugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Für den tryptischen Verdau wurden 3 µl einer 1:10 verdünnten Trypsinlösung zu jeder Proteinlösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde 3 h bei 37 °C und 1100 rpm geschüttelt. Die Beads wurden bei 8.000 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand für die Stage-Tip Aufreinigung verwendet. Dazu wurden Pipettenspitzen 5 mm unter der Fritte abgeschnitten und C18-Material in Methanol auf eine Höhe von 5 mm aufgeschichtet. Alle Wasch- und Beladeschritte erfolgten durch eine Zentrifugation bei 10.000 rpm. Die Säule mit dem C18-Material wurde dreimal mit je 100 µl Puffer A (0,1 % Essigsäure in MS-H₂O(v/v)) und zweimal mit 100 µl Puffer B (0,1 % Acetonitril-ultrapure in MS-H₂O(v/v)) gewaschen. Anschließend wurde die Säule mit 100 µl Puffer A äquilibriert und die Proteinlösung dazugegeben. Die gebundenen Peptide wurden zweimal mit 100 µl Puffer A gewaschen. Ein Analysegefäß wurde ohne Deckel gewogen und die Proteinlösung mit 30 µl 100 % Puffer B in das Analysegefäß eluiert. Das Eluat wurde zusätzlich mit 20 µl MS-Wasser versetzt und auf ein Endvolumen von 10 µl in der SpeedVac® eingengt. Das Analysegefäß wurde erneut ausgewogen und auf exakt 10 µl aufgefüllt. Als Standard für die Quantifizierung wurden 50 fmol/ 100 µl Alkohol Dehydrogenase (ADH) hinzugegeben. Zuletzt wurde zu jeder Probe 10 µl MS-Wasser dazu pipettiert und jeweils 10 µl der Lösung

vermessen. Die Messung und Auswertung erfolgte durch Dr. Daniela Zühlke und Dr. Stephan Fuchs vom Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald.

5.9.8. Western Blot

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte mit Hilfe entsprechender Antikörper in einem Western Blot auch Immunblot genannt. Hierzu wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe 5.9.3) und die Proteine anschließend auf eine Trägermembran transferiert.

Elektroblot nach dem Semi-dry-Verfahren

Die Proteine wurden mit dem Semi-dry-Verfahren auf durch einen Elektroblot auf eine PVDF Membranen übertragen. Dazu wurde eine 6,5 x 5,5 cm große PVDF Membran zunächst kurz in Methanol äquiliert. Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese kurz in Towbin-Puffer gewaschen (siehe Tabelle 5.35). Für den Blot wurden auf der Kathode des Elektroblotters drei in Towbinpuffer getränkte Whatman-Papiere, darauf die Membran, das Gel und drei weitere Whatman-Papiere Luftblasen frei aufeinander gelegt. Anschließend wurde die Anode aufgelegt und der Blot durchgeführt.

Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Blotten wurde die Membran 2 h in Blockingpuffer mit 3 % BSA oder Magermilchpulver auf einem Rollenschüttler inkubiert (siehe Tabelle 5.35). Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 bis 1:10000 verdünnten Primärantikörper in Blockingpuffer mit 1 % BSA oder Magermilchpulver ü. N. bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 min lang mit Waschpuffer gewaschen (siehe Tabelle 5.35).

Tabelle 5.35: Zusammensetzung der für den Western Blot verwendeten Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung
10 x Towbin Pufferr	30,3 g Tris-Base 144 g Glycin mit H ₂ O _{bidest.} auf 1000 ml auffüllen; 1:10 verdünnen
Waschpuffer	10 % 10x PBS 0,1 % Tween 20
Blockingpuffer	0 % 10 x PBS 0,1 % Tween 20 1-3% BSA/Magermilchpulver
Alkalische Phosphatase Puffer	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl x 6 H ₂ O mit H ₂ O _{bidest.} auffüllen und pH Wert auf 9,5 mit HCl einsetllen

Nach den Waschschritten folgte eine zwei Stündige Inkubation mit dem 1:10000 bis 1:20000 verdünnten Sekundärantikörper in Blockingpuffer mit 1 % BSA oder Magermilchpulver. Es wurden erneut drei 10 minütige Waschschritte mit Waschpuffer durchgeführt. Die Abschließende Entwicklung des Blots variierte mit dem gewählten Konjugat des Sekundärantikörpers. Bei einem Konjugat der Alkalischen Phosphatase wurde die Membran zunächst 10 min in 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer äquilibriert, dann wurden 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) und 33 µl NBT (100 mg/ml in 70 % DMF) hinzugegeben. Sobald Protein-Banden sichtbar wurden, konnte die Reaktion mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gestoppt werden. Die Detektion bei einem HORSFORD Peroxidase Konjugats erfolgte mit dem ECL Western Blotting Detection Kit nach den Angaben des Herstellers. Das Ergebnis wurde an der Chemilumineszenzanlage dokumentiert.

5.9.9. Lokalisation von PilY1 durch zelluläre Fraktionierung mit Triton X-100

Zur Lokalisation des PilY1 Proteins wurde eine zelluläre Fraktionierung durchgeführt. Die Auftrennung der einzelnen Fraktionen, insbesondere der inneren und äußeren Membran, von *L. pneumophila* wurde mit Modifikationen nach Vincent *et al.*, 2006 sowie Kuchma *et al.*, 2007 und Kuchma *et al.*, 2010 durchgeführt. Der *L. pneumophila* Corby WT wurde zunächst auf quadratischen BCYE-Agarplatten (120 x 120 mm) bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase inkubiert. Anschließend wurde der Bakterienrasen von drei Agarplatten in 20 ml Tris-HCl pH 8,0 mit 0,2 mg/ml Lysozym und 1 µg/ml DNase aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine Passage der in einer „french pressure cell“ bei einem Druck von 14000 psi aufgeschlossen. Intakte Zellen wurden durch die Zentrifugation bei 10000 g für 10 min und 4 °C pelletiert und verworfen. Das Zelllysate im Überstand wurde weiter aufbereitet und ein Teil als spätere Nachweiskontrolle, für den Western Blot, eingesetzt. Um die cytoplasmatischen Proteine von den Zellmembranen zu trennen wurde eine Zentrifugation mit der Ultrazentrifuge Optima™ L-90K und dem Rotor 70.1 Ti bei 100.000 g und 4 °C für 1 h durchgeführt. Der erhaltene Überstand wurde als cytoplasmatische Fraktion und das Pellet als Membranfraktion bezeichnet. Die innere und äußere Membran wurden durch die unterschiedliche Löslichkeit in Gegenwart des Detergenz Triton X-100 getrennt. Hierzu wurde das Membranpellet in Tris-HCl pH 8,0 mit 20 mM MgSO_4 und 1 % Triton X-100 resuspendiert und bei 100000 g sowie 4 °C erneut für 1 h zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die löslichen Proteine der inneren Membran. Die äußeren Membranen im Pellet wurde mit Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert. Von jeder Fraktion wurde die Proteinkonzentration mittels Roti®-Nanoquant bestimmt (siehe 5.9.1). Von jeweils 25 µg Protein jeder Fraktion wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt (siehe 5.9.3 und 5.9.8). Der Nachweis von PilY1 erfolgte mit dem Rabbit-anti PilY1 927 1-2 (aa

359-370) Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung in Blockingpuffer mit 1 % BSA. Die Detektion von PilY1 erfolge mit Sekundärantikörper Goat-anti Rabbit horseradish peroxidase Konjugat in der einer 1:20000 Verdünnung in Blockingpuffer mit 1 % BSA sowie dem ECL Western Blotting Detection Kit, nach den Angaben des Herstellers, an der Chemilumineszenzanlage. Zur Bestimmung der Qualität der inneren und äußeren Membranfraktionen wurde durch den Nachweis mit den Antikörpern Rabbit-anti LepB und Rabbit-anti MOMP. Hierzu wurden die Antikörper 1:2500 bzw. 1:10000 in Blockingpuffer mit 1 % Magermilchpulver verdünnt. Die Detektion erfolgte mit dem Sekundärantikörper Goat-anti Rabbit alkaline phosphatase Konjugat 1:10000 verdünnt in Blockingpuffer mit 1 % Magermilchpulver und BCIP/NBT (siehe 5.9.8).

5.9.10. Analyse der PilY1 Expression mittels Westernblot

Zur Untersuchung der Expression des *L. pneumophila* PilY1 Proteins wurde eine Western Blot Analyse in verschiedenen Wachstumsphasen durchgeführt. Hierzu wurden 40 ml YEB-Medium in einen 100 ml Erlenmeyerkolben aus einer stationären Vorkultur des *L. pneumophila* Corby WT und der *pilY1* negativen mini-Tn10 Transposonmutante D1 auf eine OD_{600 nm} von 0,02 beimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert und es wurden jeweils in der exponentiellen, der früh stationären, der stationären und der spät stationären Phase 10⁹ Bakterien entnommen. Die Zellzahl sowie die Wachstumsphase wurde anhand der optischen Dichte, OD_{600 nm} bestimmt. Die entnommenen Zellen wurden bei 5000 g für 10 min abzentrifugiert und in Lysispuffer resuspendiert und aufgeschlossen (siehe Tabelle 5.36). Die Zelllysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet (siehe 5.9.3 und 5.9.8). Der Nachweis von PilY1 erfolgte mit dem Rabbit-anti PilY1 927 1-2 (aa 359-370) Antikörper in einer 1:5000 Verdünnung Blockingpuffer mit 1 % BSA. Um die Detektionsgrenze von PilY1 zu erhöhen wurde der Sekundärantikörper Goat-anti Rabbit horseradish peroxidase Konjugat in der einer 1:20000 Verdünnung Blockingpuffer mit 1 % BSA verwendet. Die Detektion erfolge mit dem ECL Western Blotting Detection Kit nach den Angaben des Herstellers an der Chemilumineszenzanlage. Zusätzlich wurden anhand der Flagellin Expression, die stationären Wachstumsphasen mit dem Rabbit-anti FlaA Antikörper nachgewiesen. Dieser wurde 1:1000 in Blockingpuffer mit 1 % Magermilchpulver verdünnt. Die Detektion erfolgte anschließend durch eine Inkubation mit dem 1:10000 verdünnten Sekundärantikörper Goat-anti Rabbit alkaline phosphatase Konjugat und BCIP/NBT. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Mip Protein mit den Antikörpern Mouse-anti Mip 2D8 (1:500) und Goat-anti Mouse alkaline phosphatase Konjugat (1:10000) jeweils in in Blockingpuffer mit 1 % Magermilchpulver sowie BCIP/NBT detektiert (siehe 5.9.8).

Tabelle 5.36: Zusammensetzung des Lysispuffers

Lysispuffer	
7 M	Harnstoff
20 mM	Tris-HCl pH 9
100 mM	DTT
1 %	Triton X-100
20U	Benzonase

5.9.11. Heterologe Expression und Reinigung der PilY1 Domäne

Für die rekombinante Expression der PilY1 Domäne wurde der *E. coli* Rosetta Gami-2 (DE3) pvp008ZZ *pilY1*dom Stamm bei 37 °C und 200 rpm in TB Medium mit 50 µg/ml Kanamycin kultiviert. Die Induktion der PilY1 Expression erfolgte ab einer OD_{600nm} von 0,5 mit 1 mM IPTG, anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 200 rpm weiter kultiviert. Das Zellpellet aus 4L Kultur wurde für Zellyse in 200 ml Lysispuffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde bei 20.000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Zur Aufreinigung der rekombinanten PilY1 Domäne wurde bei 4 °C eine Nickel-Chelat-Chromatographie mit einer Ni-NTA Säule durchgeführt. Die Waschritte wurden mit 50 mM HEPES pH 7,4, 300 mM NaCl und 20 mM Imidazol durchgeführt. Der wurde ZZ Tag mit 2 mg der TEV Protease bei 4 °C für 72 h abgeschnitten. Im Anschluss wurden die Proteine gegen 4 L 50 mM HEPES pH 7,4 und 50 mM NaCl dialysiert. Zur weiteren Aufreinigung der PilY1 Domäne wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie mit einer Mono Q 10/100 (GE Healthcare Life Sciences) Säule sowie eine Gelfiltration mit der HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare Life Sciences) Säule durchgeführt. Die Expression und Reinigung der PilY1 Domäne erfolgte durch Dr. Jörn Krause und Claudia Hanko am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig.

5.9.12. Analyse der Ca²⁺-Interaktion von PilY1 durch Microscale Thermophorese

Um die Ca²⁺-Interaktion der PilY1 Domäne zu bestimmen, wurde eine Microscale Thermophorese durchgeführt. Im Vorfeld das PilY1 Protein von Calciumionen befreit. Dazu wurden 10 ml der PilY1 Lösung mit 0,5 g Chelex[®] 100 Resin für 1 h bei 4 °C, schüttelt inkubiert. Anschließend wurde der Chelator abzentrifugiert und das Protein mit Amicon[®] Ultra-2 mL Filtern aufkonzentriert. Um die Ca²⁺-Bindungsaffinität der PilY1 Domäne zu messen, wurden sich verringernde Konzentrationen des möglichen Bindungspartners hergestellt, während die Konzentration des fluoreszenzmarkierten PilY1 Proteins konstant blieb. Hierzu wurden zunächst 100 µl der 20 µM konzentrierten PilY1 Lösung mit dem Monolith NT[™] Protein Labeling Kit RED-NHS nach Herstellerangaben fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurde das Protein innerhalb einer 1:2-Verdünnungsreihe mit CaCl₂ in den Konzentrationen von 100 µM bis 1,5 nM versetzt. Jede Probe wurde in eine hydrophobe

Nanotemper-Kapillare (Monolith™ NT.115 Hydrophobic Capillaries, MO-K003) aufgezogen und verschlossen. Alle Messungen wurden bei 20 °C mit MST Power von 20 bzw. 40 % und einer LED Power von 25 % durchgeführt. Die Thermophorese Experimente wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Jörn Krause und Dr. Andrea Scrima am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig durchgeführt.

6. Ergebnisse

Um in phagozytischen Wirtszellen zu überleben und intrazellulär zu replizieren hat *L. pneumophila* ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren entwickelt. Ein Großteil dieser Virulenzfaktoren können den Effektoren des Dot/Icm Sekretionssystems zugeordnet werden. Im Vorfeld konnten in einem Transposonmutanten Screening jedoch potentielle Faktoren identifiziert werden, welche unabhängig von diesem zentralen Mechanismus agieren. Hierzu zählte unter anderem das *L. pneumophila* Corby PilY1 (Shevchuk *et al.*, 2014). In dieser Arbeit wurde PilY1 hinsichtlich seiner Funktion in der Pathogenität von *L. pneumophila* charakterisiert. Teile dieser Arbeit wurden aus diesem Grund mit der *pilY1* negativen mini-Tn10 Transposonmutante D1 durchgeführt. Die weiterführende Charakterisierung erfolgte jedoch mit einer *pilY1* Deletionsmutante sowie entsprechenden Komplementationssystemen.

6.1. PilY1 wird in der transmissiven Phase von *L. pneumophila* exprimiert

Wie viele andere intrazelluläre Pathogene passt *L. pneumophila* sein Expressionsprofil den unterschiedlichen Anforderungen zwischen der intrazellulären Replikation und der extrazellulären Neuinfektion von Wirtszellen an. Dieser Kreislauf ist unterteilt in die replikative und die transmissive Phase. Letztere zeichnet sich insbesondere durch die Expression von Virulenzfaktoren aus, um eine erfolgreiche Transmission sowie Etablierung der frühen LCV zu gewährleisten. Wobei diese Phasen von der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase abgeleitet werden können (Rowbotham, 1980; Molofsky and Swanson, 2004; Brüggemann *et al.*, 2006). Eine Analyse der Expression trägt demnach der Charakterisierung von PilY1 als potentiellen Virulenzfaktor von *L. pneumophila* bei. Nachgewiesen wurde die PilY1 Expression des *L. pneumophila* Corby Wildtyps und der *pilY1* negativen mini-Tn10 Transposonmutante D1. Hierzu wurden die Stämme bis zum Erreichen der spät stationären Wachstumsphase kultiviert und jeweils in der exponentiellen, der früh stationären, der stationären und der spät stationären Phase Proben entnommen. Diese wurden mit Lysispuffer aufgeschlossen anschließend mittels SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet (siehe 5.9.8). Die Detektion mit dem anti PilY1 927 1-2 Antikörper demonstrierte, dass PilY1 erst in der stationären und spät stationären Wachstumsphase exprimiert wird und demzufolge mit der transmissiven Phase von *L. pneumophila* korreliert. Hingegen fand in der *pilY1* negativen Transposonmutante keine PilY1 Expression statt. Die transmissive bzw. die stationären Wachstumsphasen konnten durch den Nachweis der Flagellin Untereinheit FlaA entsprechend zugeordnet werden. Desweiteren zeigte der Nachweis des konstitutiv

exprimieren Mip Proteins, dass jeweils vergleichbare Zellkonzentrationen zur Analyse eingesetzt wurden (siehe Abbildung 6.1).

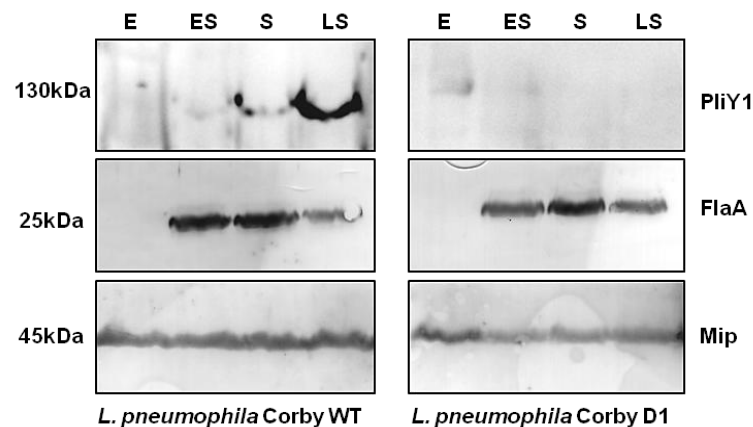


Abbildung 6.1: Western Blot Analyse der PilY1 Expression in *L. pneumophila* Corby. Nachgewiesen wurde die Expression der Proteine PilY1 sowie FlaA und Mip durch Immunodetektion mit den entsprechenden Antikörpern. Das Protein FlaA diente als Indikator für die stationäre Wachstumsphase und Mip als Kontrolle für den Einsatz äquivalenter Zellzahlen. Hierzu wurden der *L. pneumophila* Corby WT und die *pilY1* mini-Tn10 Transposonmutante *L. pneumophila* Corby D1 bis zum Erreichen der spät stationären Wachstumsphase kultiviert. Die Zellysate aus der exponentiellen (E), früh stationären (ES), stationären (S) und spät stationären (LS) Wachstumsphase wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. Die PilY1 Expression des Wildtyps ist nur in der stationären und spät stationären Phase zu beobachten. In der *pilY1* Transposonmutante findet keine PilY1 Expression statt.

6.2. Das *L. pneumophila* PilY1 ist in der äußeren Membran lokalisiert

Erste wichtige Erkenntnisse über mögliche Funktionen lassen sich durch die zelluläre Lokalisation dieser Proteine gewinnen. Gemäß den Analyseprogrammen SignalP und PSORTB 3.0.2. könnte PilY1 über ein N-terminales Signalpeptid verfügen und in der äußeren Membran lokalisieren bzw. in den Kulturüberstand sezerniert werden (Emanuelsson *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Um die zelluläre Lokalisation von PilY1 zu bestimmen, wurden *L. pneumophila* Corby Zellen fraktioniert. Hierzu wurden die Zellen einer stationären Kultur aufgeschlossen und durch Ultrazentrifugation die löslichen Proteine des Zytosols von den Zellmembranen getrennt. Anschließend wurden die inneren und äußeren Membranproteine mittels Triton X-100 in einem erneuten Ultrazentrifugationsschritt separiert. Dies ist möglich, da die inneren Membranproteine der meisten Gram negativen Bakterien in dem Detergenz Triton X-100 löslich sind, jedoch die Proteine der äußeren Membran üblicherweise nicht (Nikaido, 1994; Vincent *et al.*, 2006). Auf diese Weise wurden die *L. pneumophila* Corby Zellen in vier verschiedene Fraktionen separiert, die cytoplasmatische Fraktion, sowie die komplette Membranfraktion und die innere und äußere Membranfraktion. Diese Fraktionen sowie das Zellysat, als Positivkontrolle, wurden anschließend mittels SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet (siehe 5.9.8). Die Qualität der inneren und äußeren Membranfraktionen

wurde durch den Nachweis der Signalpeptidase LepB, welche in der inneren Membran lokalisiert und dem außen Membranprotein MOMP (major outer membrane protein) überprüft (Gabay *et al.*, 1985; Lammertyn *et al.*, 2004). PilY1 konnte mit dem anti PilY1 927 1-2 Antikörper in der Membranfraktion, insbesondere in der äußeren Membranfraktion detektiert werden. Eine Kontamination zwischen der äußeren und inneren Membran war nicht zu beobachten. Folglich lokalisiert PilY1 in der äußeren Membran von *L. pneumophila* Corby (siehe Abbildung 6.2).

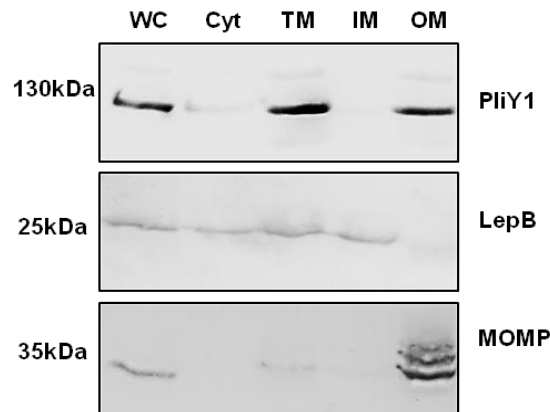


Abbildung 6.2: Western Blot Analyse zur zellulären Lokalisation von PilY1. Nachgewiesen wurde die Lokalisation der Proteine PilY1 sowie LepB und MOMP durch Immunodetektion mit den entsprechenden Antikörpern. Hierzu wurde der *L. pneumophila* Corby WT bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert und das Zelllysate mittels Ultrazentrifugation und Triton X-100 fraktioniert. Das Zelllysate (WC), sowie die cytoplasmatische (Cyt), Membran- (TM), innere Membran- (IM) und äußere Membran-Fraktion (OM) wurden mittels SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. Dabei wurde Qualität der einzelnen Fraktionen durch LepB, welches in der inneren Membran lokalisiert und MOMP, welchen in der äußeren Membran lokalisiert, überprüft. PilY1 konnte in der äußeren Membran nachgewiesen werden.

6.3. PilY1 beeinflusst die Inhibition der phagolysosomalen Fusion in der *L. pneumophila* Infektion

Die *pilY1* negative Mutante D1 wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit die phagolysosomale Fusion zu inhibieren in einem Transposonmutanten Screening selektiert. Um diesen Phänotyp zu verifizieren, wurden lysosomale Kolokalisationsstudien in *D. discoideum* mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Hierzu wurde der *L. pneumophila* Corby Wildtyp, die mini-Tn10 Transposonmutante D1 sowie ein *dotA* negativer und ein hitzeinaktivierter WT (Hi) Stamm als Kontrollen verwendet. Diese wurden mit Rhodamin markiert und die Kolokalisation mit dem lysosomalen Marker Mannose 6-Sulfat (M-S-6) wurde, nach 4 stündiger Infektion, quantifiziert (siehe Abbildung 6.3). Die Quantifizierung erfolgte ausgehend von 100 ausgewerteten LCVs aus je drei biologischen Replikaten pro Stamm. Die Anzahl der M-S-6 positiven LCVs des *L. pneumophila* Corby Wildtyps ist signifikant reduziert im Vergleich zur *dotA* negativen Mutante, welche doppelt so viele Kolokalisationsereignisse aufweist. Ferner konnte eine Kolokalisation der LCV mit den

Lysosomen bei der hitzeinaktivierten Negativkontrolle in über 90 % der Fälle beobachtet werden. Die Kolokalisationsrate der *pilY1* negativen Mutante D1 war vergleichbar mit der, der *dotA* negativen Mutante, und signifikant höher als der *L. pneumophila* Corby Wildtyps. Somit kann davon ausgegangen werden, dass PilY1 die Inhibition der phagolysosomalen Fusion in der *L. pneumophila* Infektion beeinflusst.

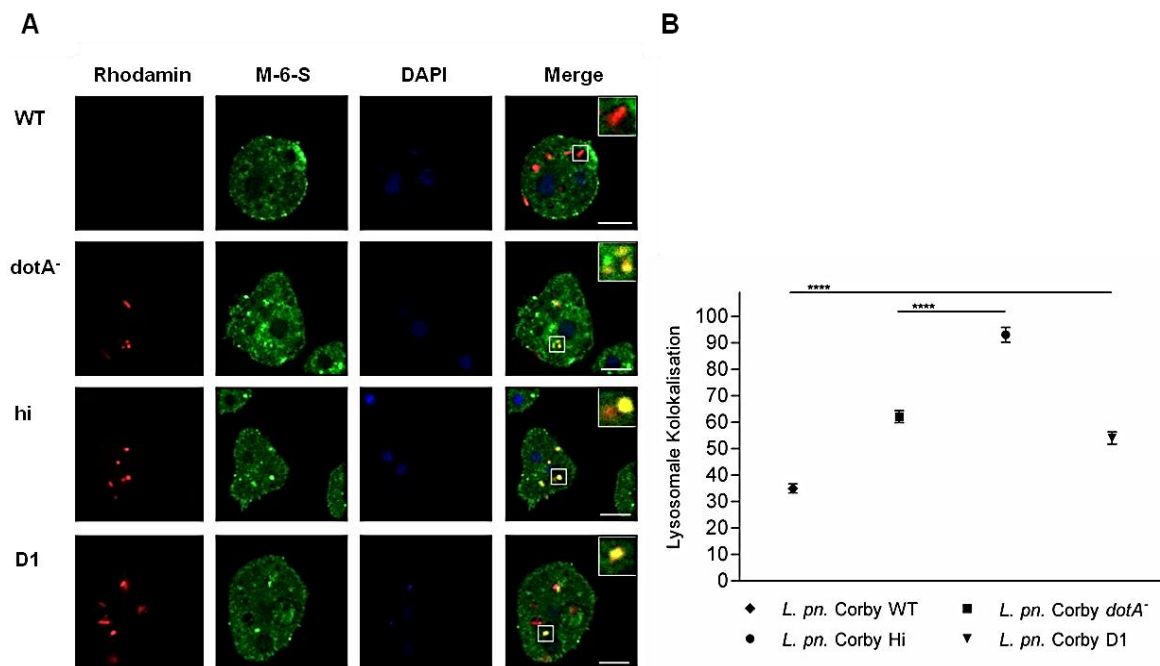


Abbildung 6.3: Kolokalisation von LCVs mit Lysosomen während der Infektion in *D. discoideum*. *D. discoideum* Zellen wurden mit dem Rhodamin gefärbten (rot) *L. pneumophila* Corby (WT), der *pilY1*-negativen mini-*Tn10* Transposonmutante (D1), Hitze-inaktivierten *L. pneumophila* Corby (Hi) und der *dotA*-negativen mini-*Tn5* Transposonmutante (*dotA*⁻) infiziert. Nach 4 h Infektion, wurden die Zellen fixiert und die Lysosomen mit dem Mannose-6-Sulfat (M-6-S) Antikörper markiert (green). (A) Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der Kolokalisation der mit Rhodamin gefärbten Bakterien mit M-6-S markierten Lysosomen. Maßstab = 1 µm. (B) Quantitative Auswertung der Kolokalisationsereignisse von 100 analysierten LCVs, pro getesteten Stamm aus drei biologischen Replikaten. Die statistische Relevanz wurde mit Hilfe des Student's *t*-test ermittelt. (****, $p \leq 0,00001$). Bei der Einheit handelt es sich um beliebige Fluoreszenz-Einheiten. (modifiziert nach Shevchuk *et al.*, 2014)

6.4. Beeinflussung des Sekretoms von *L. pneumophila* durch PilY1

In vorangegangenen Arbeiten konnte anhand von eindimensionalen SDS-Gelen bereits gezeigt werden, dass die *pilY1* negative mini-*Tn10* Transposonmutante D1 im Vergleich zum Wildtyp ein verändertes Sekretionsprofil aufweist (Julia Hoppe, 2011). Aus diesem Grund sollte das Sekretom der *pilY1* negativen mini-*Tn10* Transposonmutante weiterführend analysiert werden. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese aber auch mittels gelfreier Methoden durch Messungen mit der Orbitrap oder Synapt, um die mögliche Ungenauigkeit der einzelnen Messmethoden zu umgehen. So ermöglicht eine Analyse durch die 2D-Gelelektrophorese zwar einen direkten visuellen Vergleich der einzelnen Sekretionsprofile, gleichzeitig verringert die gelbasierte Analyse

aber auch die Sensitivität. So könnten z. B. hydrophobe Proteine in IEF schlechter aufgetrennt werden. Generell werden Proteine, die im Bezug auf ihr Molekulargewicht oder *pI* nicht in dem gewählten analytischen Bereich fallen, nicht erfasst werden. Bei den Messungen mit der Orbitrap kann es dagegen zu Überlagerungen mancher Peptide durch höher Abundante kommen oder dazu, dass einige Peptide nicht ionisiert und somit nicht detektiert werden können. Ferner lassen sich die unterschiedlichen Abundanzen der sezernierten Proteine durch die „spectral counts“ nur indirekt quantifizieren. Eine Messung mit der Synapt ermöglichte hingegen, durch die Zugabe eines internen Standards, eine absolute Quantifizierung der einzelnen Proteine. Jedoch war für die Synapt-Messungen eine Umpufferung der Proteine notwendig, was wiederum einen Verlust von Proteinen zur Folge haben kann.

Insgesamt wurden die isolierten Proteine des *L. pneumophila* Corby Wildtyps und der *pilY1* negativen mini-Tn10 Transposonmutante D1 aus drei biologischen Replikaten mit allen drei Methoden analysiert. Darunter wurden 30 Proteine identifiziert, welche in den jeweiligen Sekretomen signifikant akkumuliert waren. Davon verfügten 13 Proteine über eine mit der Software SignalP 4.1 vorhergesagte Signalsequenz und können somit den sezernierten Proteinen zugeordnet werden (siehe Tabelle 6.1). Eine Auflistung aller signifikant akkumulierten Proteine sowie die Analyse der 2D-Gelelektrophorese ist dem Anhang zu entnehmen (Tabelle 8.1 und Abbildung 8.2).

Tabelle 6.1: Im Sekretom signifikant akkumulierte Proteine mit Signalsequenz

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP	Akkumuliert
YP001249366.1	LPC_0020	LasB; Hemagglutinin Protease	Cs	D1 ²
YP001250736.1	LPC_1440	PpiA; Cyclophilin-type Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	Cs	D1 ²
YP001251599.1	LPC_2331	Hypothetical Protein	Cs	WT ²
YP001251686.1	LPC_2419	Hypothetical Protein	Cs	WT ²
YP001251790.1	LPC_2529	Hypothetical Protein	Cs	WT ²
YP001251959.1	LPC_2701	Hypothetical Protein	Cs	WT^{2,3}
YP001252339.1	LPC_3106	Tyrosine Phosphatase II superfamily transporter Protein	Cs	WT ²
YP001252124.1	LPC_2877	ProA; zinc metalloprotease	Cs	D1 ¹
YP001251599.1	LPC_2331	Hypothetical Protein	Cs	WT^{1,2}
YP001250698.1	LPC_1400	Hypothetical Protein	Cs	WT ¹
YP001250798.1	LPC_1503	Serine Metalloprotease	Cs	WT ¹
YP001250954.1	LPC_1671	Hypothetical Protein	Cs	D1 ³
YP001250192.1	LPC_0870	Phospholipase C	Cs	WT ³

1: Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese identifiziert wurden

2: Proteine, die mittels Orbitrap identifiziert wurden

3: Proteine, die mittels Synapt identifiziert wurden

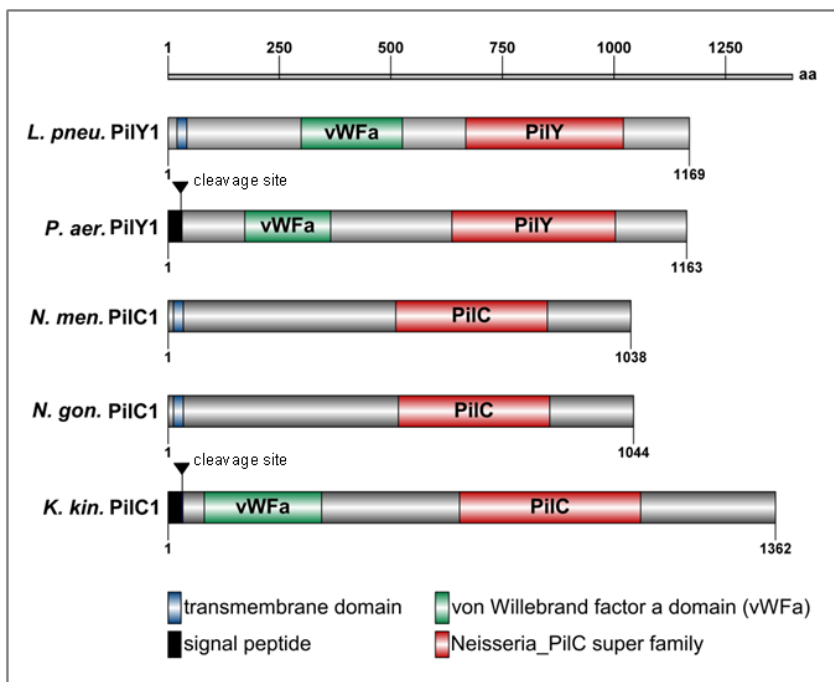
Im Sekretom des *L. pneumophila* Corby Wildtyps konnten 15 signifikant akkumulierte Proteine identifiziert werden, davon verfügen 9 Proteine über ein Signalpeptid. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem 6 hypothetische Proteine, welche keinerlei Homologien zu anderen Proteinen aufweisen. Besonders hervor zu heben ist hierbei, dass die Proteine LPC_2701 und LPC_2331 mit zwei unterschiedlichen Methoden identifiziert wurden. Desweiteren zählten zu den signifikant akkumulierten Proteinen eine Tyrosin Phosphatase sowie eine Serin Metalloprotease und die Phospholipase C. Im Sekretom der *pilY1* negativen mini-Tn10 Transposonmutante D1 konnten ebenfalls 15 signifikant akkumulierte Proteine identifiziert werden, jedoch verfügen darunter nur 4 Proteine über ein Signalpeptid. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die Hemagglutinin Protease LasB, die Cyclophilin Peptidylprolyl-*cis/trans*-Isomerase PpiA, die Zink Metalloprotease ProA sowie ein hypothetisches Protein, LPC_1671, welches keine weiteren Homologien aufweist. Ferner bleibt zu erwähnen, dass die Proteine aus der 2D-Gelelektrophorese Analyse jeweils nur aus einem der drei Replikate identifiziert wurden.

6.5. Das *L. pneumophila* PilY1 weist Homologien zu anderen Spezies auf

Das *L. pneumophila pilY1* ist annotiert als Faktor der Typ IV Pilus-Biogenese und PilY1 ähnliches Protein. Wichtig für die weitere Charakterisierung sind zusätzliche Informationen über die Struktur des Proteins sowie mögliche Homologien. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des Proteins bioinformatisch analysiert, um so Rückschlüsse auf potentielle Funktionen schließen zu können. Mittels des NCBI Protein BLAST und der Pfam (Protein Families) Datenbank wurde eine Suche nach homologen konservierten Domänen durchgeführt (Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Finn *et al.*, 2014). Das *L. pneumophila* PilY1, insbesondere der C-Terminus weist Homologien zu dem PilY1 von *Pseudomonas aeruginosa* sowie zu den PilC Proteinen von *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* und *Kingella kingae* auf. Ein schematisches Diagramm der vorhergesagten funktionellen Proteindomänen des *L. pneumophila* PilY1 basierend auf den Sequenzhomologien zum *P. aeruginosa* PilY1, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und *K. kingae* PilC1 ist in der Abbildung 6.4 dargestellt. Am N-Terminus des PilY Proteins konnte eine Transmembrandomäne sowie ein potentielles Signalpeptid identifiziert werden. Gleiches gilt für das PilC1 von *K. kingae*. Ferner verfügt das PilY1 von *P. aeruginosa* über ein Signalpeptid mit einer entsprechenden Schnittstelle zur Translokation durch das Sec Sekretionssystem (Lewenza *et al.*, 2005; Kuchma *et al.*, 2010). Darüber hinaus konnte eine 200 Aminosäuren lange Region im N-terminalen Bereich identifiziert werden, welche Homologien zu der von Willebrand Faktor A (vWFA) Domäne aufweist. Diese vWFA Domäne konnte ebenfalls bei dem PilY1 von *P. aeruginosa* und bei dem PilC1 von *K. kingae* identifiziert werden (Kuchma *et al.*, 2010). Von Willebrand Faktor Domänen liegen

hauptsächlich bei eukaryotischen Proteinen vor, welche in der extrazellulären Matrix assoziiert oder an der Zelladhäsion beteiligt sind.

A



B

overall	<i>L.p.</i>	<i>P.a.</i>	<i>N.m.</i>	<i>N.g.</i>	<i>K.k.</i>	vWFa	<i>L.p.</i>	<i>P.a.</i>	<i>N.m.</i>	<i>N.g.</i>	<i>K.k.</i>	PilYdom	<i>L.p.</i>	<i>P.a.</i>	<i>N.m.</i>	<i>N.g.</i>	<i>K.k.</i>
<i>L.p.</i>	100	30.1	20.6	20.8	19.8	<i>L.p.</i>	100	18	n.a.	n.a.	23.8	<i>L.p.</i>	100	43.6	30.5	30.5	25.7
<i>P.a.</i>		100	20	21	21.5	<i>P.a.</i>		100	n.a.	n.a.	15.3	<i>P.a.</i>		100	31.8	32.1	29.6
<i>N.m.</i>			100	72.2	30.1	<i>N.m.</i>			n.a.	n.a.	n.a.	<i>N.m.</i>			100	67.4	40.4
<i>N.g.</i>				100	28.8	<i>N.g.</i>				n.a.	n.a.	<i>N.g.</i>				100	36.6
<i>K.k.</i>					100	<i>K.k.</i>					100	<i>K.k.</i>					100

Abbildung 6.4: Struktur Analyse des *L. pneumophila* PilY1 und seiner homologen Proteine. (A) Postulierte Domänenstruktur von PilY1 und der PilY ähnlichen Proteine der Stämme *L. pneumophila* Corby, *P. aeruginosa* PAK, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* und *K. kingae*. Die Sequenzanalyse wurde durchgeführt mit dem Programm SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) und das Diagramm wurde mit dem Programm IBS (illustrator of biological sequences) erstellt (Letunic *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015). (B) Die prozentualen Homologiegrade des gesamten PilY1 Proteins als auch der vWFa- und PilY Domäne wurden mit dem Programm Clustal Omega berechnet (Sievers *et al.*, 2011).

Die größten Homologien liegen im C-terminalen Bereich vor. Hier konnte eine *Neisseria_PilC* Domäne identifiziert werden, welche auch in den Proteinen von *P. aeruginosa*, pathogenen *Neisseria* Spezies und *K. kingae* vorliegt. Die stärkste Übereinstimmung mit 43 % aa Vergleichbarkeit besteht zu dem PilY1 Protein von *P. aeruginosa*. Aus diesem Grund wird diese Domäne im Weiteren als PilY-Domäne bezeichnet. Diese homologen Domänen von *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und *K. kingae* beeinflussen unter anderem die der Typ IV Pilus-Biogenese und Stabilität (Orans *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2011; Porsch *et al.*, 2013; Cheng *et al.*,

2013). Desweiteren konnten Übereinstimmungen mit dem PilY1 von *Xylella fastidiosa* und *Variovorax paradoxus* identifiziert werden (siehe Abbildung 7.1).

6.6. Mutagenese zur funktionellen Analyse des *L. pneumophila* pilY1

Zur weiteren Charakterisierung des *L. pneumophila* Corby PilY1, und um etwaige Sekundäreffekte durch eine Insertion des mini-Tn10 Transposons in weiteren Analysen ausschließen zu können, wurde eine Deletionsmutagenese des *pilY1* Gens durchgeführt. Desweiteren wurden funktionelle Komplementationskonstrukte des *pilY1* Gens bzw. der von Willebrand Faktor A Domäne und der PilY1 Domäne erstellt, um beobachtete Phänotypen zu verifizieren oder auf einzelne Domänen zurückführen zu können.

6.6.1. Deletionsmutagenese des *L. pneumophila* pilY1 Gens

Zur Mutagenese des *L. pneumophila* Corby *pilY1* Gens wurden zunächst die 5'- und 3'-flankierenden Regionen (1491 bp und 1541 bp) amplifiziert und zusammen mit der *nptI* Kanamycin-Kassette (850 bp) in einem erneuten PCR Schritt zu einem Deletionskonstrukt (3882 bp) verbunden. Das Deletionskonstrukt wurde mit einem pGEM®-T Easy Vektor ligiert. Aus einem positiven *E. coli* DH10 β Klon wurde das korrekte Plasmid anschließend reisoliert und als Template für die Amplifikation des Deletionskonstrukts zur Mutagenese verwendet (siehe Abbildung 6.5).

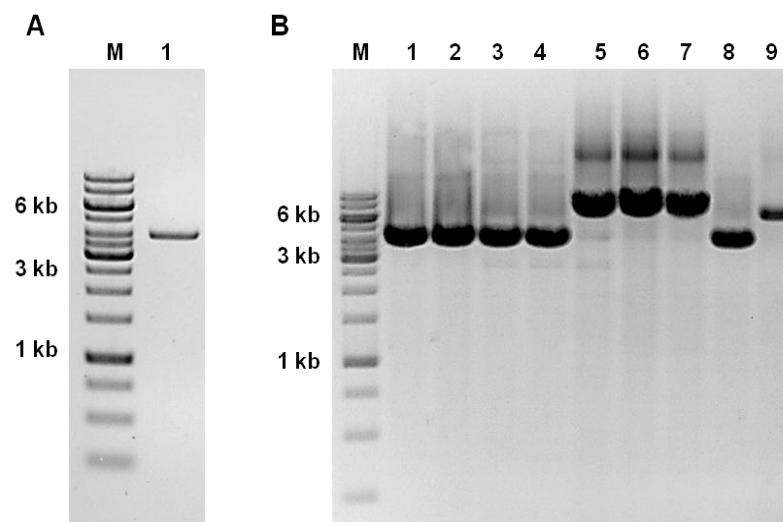


Abbildung 6.5 Amplifikation des Deletionskonstrukts und Überprüfung Δ *pilY1* Mutanten. Abgebildet ist ein 1 %iges Agarosegel nach der Ethidiumbromidfärbung. Als Größenstandart wurde die 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder verwendet. (A) Amplifikation des *pilY1* Deletionskonstrukts auf dem Plasmid pGEM®-T *pilY1::nptI* zur Transformation in *L. pneumophila* Corby. (B) Kolonie PCR der Transformanten mit den Primern PilYconf F/R. (1-4 bzw. 5-8) Einzelkolonien aus zwei verschiedenen Klonen isoliert. (9) *L. pneumophila* Corby WT. Ein PCR Produkt der Größe von 3882 bp entspricht einem Austausch des *pilY1* durch homologe Rekombination.

Anschließend wurde *L. pneumophila* Corby Δ *pilY1* durch Sequenzierung verifiziert. Dabei wurden im Abgleich mit der NCBI Datenbank in dem Gen LPC_2668 *comA* an den

Positionen 638 bp und 551 bp zwei stumme Punktmutationen identifiziert. In einem Abgleich mit dem zur Mutagenese verwendeten *L. pneumophila* Corby WT Stamm konnten diese Punktmutationen ebenfalls identifiziert werden.

6.6.2. Funktionelle Komplementation des *L. pneumophila pilY1* Gens

Zur Komplementation der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Deletionsmutante wurden Komplementationskonstrukte zur Expression des nativen PilY1 (WT PilY1) erstellt sowie der verkürzten Formen, mit einer Deletion der vWFa Domäne ($\Delta vWFa$; $\Delta 1792$ -3506 bp) oder der PilY-Domäne ($\Delta PilYdom$; $\Delta 1212$ -1793 bp) erstellt. Hierzu wurde das komplette *pilY1* Gen (3529 bp) sowie die *pilY1* Fragmente $\Delta vWFa$ (1807 bp) und $\Delta PilYdom$ (2929 bp) mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels der Restriktionsschnittstellen der Enzyme *EcoRI* und *XbaI* in den Vektor pXDC ligiert. Die erhaltenen Plasmide pXDC WT*pilY1*, pXDC $\Delta pilY1dom$ und pXDC $\Delta vWFa$ wurden durch einen Testverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* sowie durch eine Sequenzierung überprüft (siehe Abbildung 6.6).

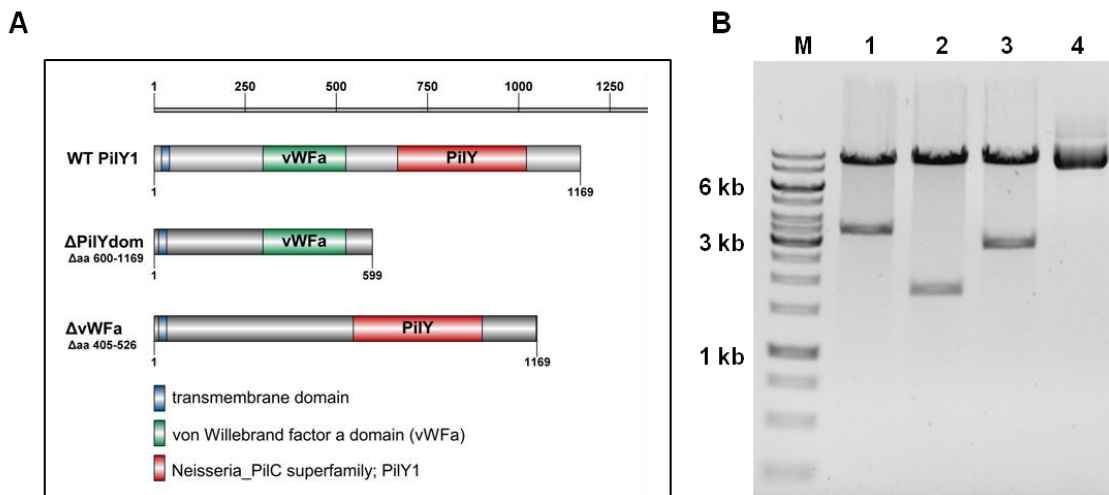


Abbildung 6.6: Schematische Darstellung und Überprüfung der Komplementationskonstrukte. (A) Domänenstruktur der in den Vektor pXDC klonierten Komplementationskonstrukte WT*pilY1*, $\Delta pilY1dom$ und $\Delta vWFa$. Das Diagramm wurde mit dem Programm IBS (illustrator of biological sequences) erstellt. (B) Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI*. Abgebildet ist ein 1 %iges Agarosegel nach der Ethidiumbromidfärbung mit dem Größenstandard 1 kb GeneRuler® DNA-Ladder. Die Plasmide pXDC WT*pilY1* (1), pXDC $\Delta pilY1dom$ (2) und pXDC $\Delta vWFa$ (3) wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* geschnitten. Zu beobachten ist jeweils der linearisierte Vektor pXDC sowie das native *pilY1* (1) mit einer Größe von 3529 bp, der *pilY1* N-Terminus mit der vWFa Domäne (2) mit einer Größe von 1807 bp und der *pilY1* C-Terminus mit der PilY1 Domäne sowie Signalpeptid (3) mit einer Größe von 2929 bp.

Die Komplementationskonstrukte pXDC WT*pilY1*, pXDC $\Delta pilY1dom$ und pXDC $\Delta vWFa$ wurden per Elektroporation in die *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Deletionsmutante eingebracht. Die Komplementante wurde mithilfe einer Kolonie PCR verifiziert. Da die exakte Position des *pilY1* Promotors bzw. des entsprechenden Operons unbekannt ist,

erfolgt die Expression der Komplementationskonstrukte über den IPTG induzierbaren *tac* Promotor des pXCD Vektors.

6.7. PilY1 ist an der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* beteiligt

Der zentrale Aspekt in der Pathogenese von *L. pneumophila* ist die intrazelluläre Replikation in professionellen Phagozyten, dazu zählen in natürlichen Habitaten in erster Linie Amöben sowie bei einer Infektion der Lunge alveolare Makrophagen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass PilY1 die Inhibition der phagolysosomalen Fusion beeinflusst, sollte dieser intrazelluläre Phänotyp weiter analysiert werden. Zunächst wurde der Einfluss von PilY1 für die intrazelluläre Replikation, unter Umweltbedingungen, in der Amöbe *D. discoideum* bestimmt. Desweiteren wurde die Funktion von PilY1 auf die humane Lungeninfektion untersucht. Dazu wurden Infektionsstudien mit humanem, explantiertem Lungengewebe durchgeführt sowie dieser Phänotyp durch Infektionen mit humanen Makrophagen und Lungenepithelzellen detaillierter analysiert.

6.7.1. PilY1 beeinflusst die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in *D. discoideum*

D. discoideum ist ein etablierter Modellorganismus zur Untersuchung der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* in Amöben. Für die nähere Charakterisierung des Einflusses von PilY1 wurden Infektionsversuche mit der *pilY1* negativen Mutante und der *pilY1*-Komplementante sowie dem *L. pneumophila* Corby Wildtyp und der replikationsgeschwächten, *dotA* negativen, Mutante als Kontrollstämme durchgeführt. Dafür wurden 5×10^5 *D. discoideum* Zellen/ml mit einer MOI von 0,02 infiziert. Zu den Zeitpunkten 2, 24, 48, 72 und 94 Stunden wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Platten ermittelt. In Abbildung 6.7 ist die intrazelluläre Replikation der untersuchten Stämme in *D. discoideum* gezeigt. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige und in Doppelbestimmung durchgeführte Experimente ausgewertet und die Vermehrungsrate logarithmisch dargestellt.

Nach 24-stündiger Infektion war zunächst eine leichte Verringerung der Zellzahl bei allen Stämmen zu beobachten. Der *L. pneumophila* Corby Wildtyp weist jedoch im Anschluss eine kontinuierliche Replikation auf, sodass am Ende der Infektion eine Vermehrungsrate von ca. 2 log stufen zu beobachten war. Die Vermehrungsrate der *pilY1* negativen Mutante betrug hingegen nur ca. eine log Stufe und weist somit im Vergleich zum Wildtyp eine signifikante Reduktion der interzellulären Replikation auf. Die Komplementation mit *pilY1* konnte die Vermehrungsrate des Wildtyps wiederherstellen. Im Gegensatz dazu wurde die Negativkontrolle *L. pneumophila* Corby $\Delta dotA$ im Verlauf der Infektion vollständig degradiert. Bereits nach 24 Stunden der Infektion ist dieser Abbau der Bakterien zu

beobachten. PilY1 trägt somit zur intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* in *D. discoideum* bei.

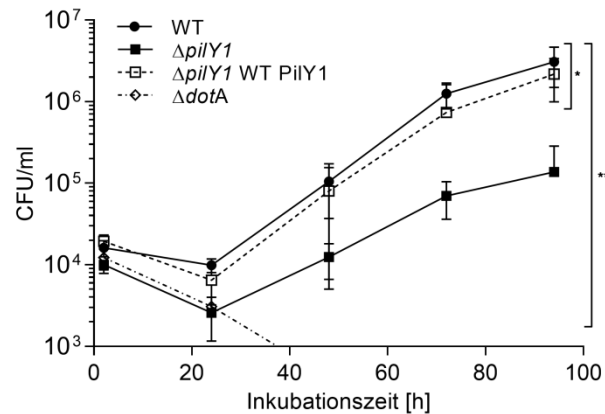


Abbildung 6.7: Infektion von *D. discoideum* mit der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante. *D. discoideum* wurde mit *L. pneumophila* Corby (WT) der *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$), der *pilY1* Komplementante (WT PilY1) und der *dotA* Deletionsmutante ($\Delta dotA$) infiziert. Die Infektionen wurden nach einer Inkubationszeit von 2 h, 24 h, 48 h, 72 h und 94 h ausplattiert und die CFU/m bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten, jeweils in Doppelbestimmung. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

6.7.2. PilY1 beeinflusst die Pathogenität von *L. pneumophila* in HLTE Infektionen

Die *ex vivo* Infektion von humanem, explantierten Lungengewebe (HLTEs) ermöglicht die Simulation einer humanen *L. pneumophila* Infektion. Hierbei kann die Interaktion von *L. pneumophila* mit seinen Wirtszellen innerhalb des Gewebes ohne die Limitationen von Zellkultursystemen oder Tiermodellen analysiert werden (Jäger *et al.*, 2014). Zur Analyse des Einflusses von PilY1 auf die Pathogenität von *L. pneumophila* während der Infektion von humanem Lungengewebe wurden HLTEs Infektionen durchgeführt. Hierzu wurden die HLTEs mit der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante und der *pilY1* Komplementante sowie dem *L. pneumophila* Corby Wildtyp und der replikationsgeschwächten, $\Delta dotA$ Deletionsmutante infiziert und über 48 Stunden in Lungeninfektionsmedium kultiviert. Nach 2, 24 und 48 Stunden wurden die HLTEs jeweils gewogen, homogenisiert und die Anzahl der Bakterien pro Gramm Gewebe durch Ausplattieren auf BCYE-Platten bestimmt. In der Abbildung 6.8 ist Replikationsrate der verwendeten Stämme innerhalb des Lungengewebes logarithmisch dargestellt.

Verwendet wurden hierzu die Daten von jeweils zwei Infektionen von insgesamt 6 verschiedenen Donoren. Die $\Delta pilY1$ Deletionsmutante weist in der Infektion von HLTEs einen signifikanten Vermehrungsdefekt auf. So ist die Replikationsrate der $\Delta pilY1$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach 48 Stunden Infektion um das 4-fache reduziert. Dieser Vermehrungsdefekt konnte durch die Komplementation mit *pilY1* zu großen Teilen wieder hergestellt werden. Der *L. pneumophila* Corby Wildtyp weist eine kontinuierliche

Replikation ca. 1,5 log Stufen auf. Die $\Delta dotA$ Deletionsmutante zeigte hingegen keine Vermehrung innerhalb des Gewebes.

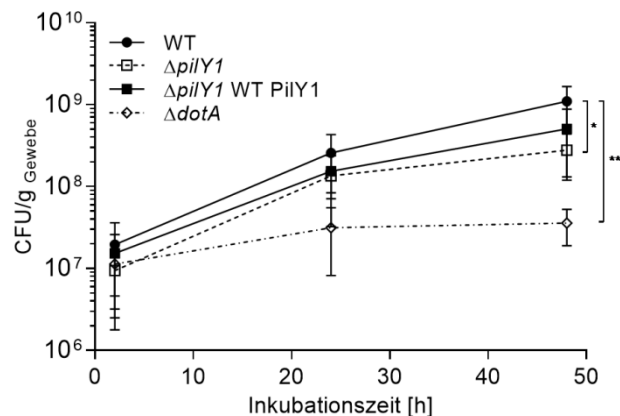


Abbildung 6.8: Infektion von humanem Lungengewebe mit der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante. HLTEs; humanes, explantiertes Lungengewebe wurde mit *L. pneumophila* Corby (WT) der *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$), der *pilY1* Komplementante (WT PilY1) und der *dotA* Deletionsmutante ($\Delta dotA$) infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h, 24 h, 48 h wurden die HLTEs gewogen, homogenisiert und die CFU/g Gewebe bestimmt. Der Graph zeigt die Ergebnisse von 6 Donoren mit jeweils zwei Infektionen. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$).

6.7.3. PilY1 beeinflusst die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen und Lungenepithelzellen

Alveolare Makrophagen und Epithelzellen gehören zu den vorrangigen Wirtszellen für *L. pneumophila* während der Infektion von humanem Lungengewebe (Mody *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1998; Jäger *et al.*, 2014). Um den beobachteten Replikationseffekt von PilY1 eingehender zu untersuchen, wurden Infektionen in monozellulären Systemen mit THP-1 Makrophagen und A549 Epithelzellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante und der *pilY1* Komplementante sowie dem *L. pneumophila* Corby Wildtyp und der $\Delta dotA$ Deletionsmutante, als Negativkontrolle, infiziert. Für die Infektion der THP-1 Makrophagen wurden eine MOI von 1 und für die A549 Epithelzellen eine MOI von 10 gewählt. Nach 2, 24 und 48 Stunden Infektion wurde die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch Ausplattieren auf BCYE-Platten ermittelt. In Abbildung 6.7 ist die intrazelluläre Replikation der untersuchten Stämme in THP-1 Makrophagen und A549 Epithelzellen gezeigt. Hierzu wurden jeweils drei unabhängige, in Doppelbestimmung, durchgeführte Experimente ausgewertet und die Vermehrungsrate logarithmisch dargestellt.

Konsistent zu den Ergebnissen der HLTE-Infektionen zeigte die $\Delta pilY1$ Mutante in beiden Wirtszellsystemen einen signifikanten Replikationsdefekt, nach 24 und 48 Stunden Infektion, im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp. Dieser Defekt war in der THP-1 Makrophagen Infektion am Stärksten ausgeprägt, in diesem Fall ist die Replikationsrate um

bis zu 2 log Stufen geringer, als die des Wildtyps. Die Replikationsrate der $\Delta pilY1$ Mutante in den A549 Zellen ist hingegen um ca. 1 log Stufe reduziert. Durch die Expression von PilY1 ließ sich der Replikationsdefekt sowohl in den THP-1 Makrophagen als auch A549 Epithelzellen komplementieren. Die $\Delta dotA$ Deletionsmutante zeigte in beiden Wirtszellsystemen keine oder eine nur sehr geringe Vermehrung. So konnte der im Lungengewebe beobachtete Replikationseffekt auch in alveolaren Makrophagen und Epithelzellen nachgewiesen werden und demonstriert den Einfluss von PilY1 auf die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in humanen Zellen.

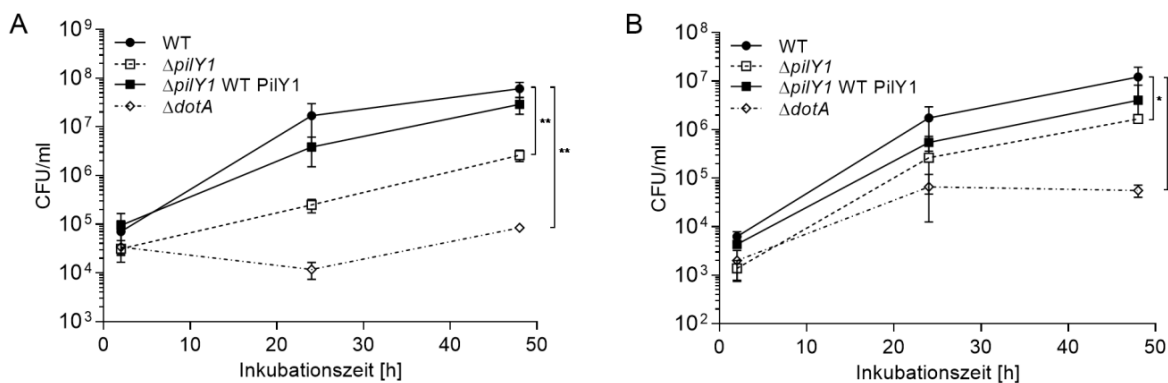


Abbildung 6.9: Infektion von Makrophagen und Lungenepithelzellen mit der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante. THP-1 Makrophagen (A) und A549 Zellen (B) wurden mit *L. pneumophila* Corby (WT) der *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$), der *pilY1* Komplementante (WT PilY1) und der *dotA* Deletionsmutante ($\Delta dotA$) infiziert. Die Infektionen wurden nach einer Inkubationszeit von 2 h, 24 h und 48 h ausplattiert und die CFU/ml bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten, jeweils in Doppelbestimmung. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

6.8. PilY1 ist an der Initiierung der Interaktion zwischen *L. pneumophila* und der Wirtszelle beteiligt

Die Adhäsion an Wirtszellen durch pathogene Bakterien hat in der Regel einen unmittelbaren Einfluss auf die Phagozytose durch eben diese Wirtszellen. Darüber hinaus ist auch eine Beeinflussung dieser Adhäsions- und Invasionsmechanismen auf den frühen endosomalen Signalweg in der Wirtszelle möglich. Somit spielt auch die effiziente Adhäsion und Internalisierung in eine Wirtszelle eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von *L. pneumophila* (Samrakandi *et al.*, 2002). Dennoch ist eine exakte Unterscheidung der Adhäsions- sowie der resultierenden Invasionsprozesse häufig nur schwer möglich. Unter Berücksichtigung der Annotation von *pilY1* als möglicher Faktor der Typ IV Pilus-Biogenese und der beobachteten Attenuation der intrazellulären Replikation sollte der Einfluss von *pilY1* auf die Adhäsion und Invasion von *L. pneumophila* Corby untersucht werden.

6.8.1. Die Invasion von *L. pneumophila* in *D. discoideum* ist abhängig von PilY1

Zur Untersuchung der Invasionseffizienz der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Deletionsmutante unter Umweltbedingungen, wurden Invasionsexperimente mit dem Modellorganismus *D. discoideum* durchgeführt. Dazu wurde die Phagozytose bzw. Invasionsrate des *L. pneumophila* Corby Wildtyps, der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante und der *pilY1* Komplementanten, welche das native PilY1 (WT PilY1) sowie die verkürzten Formen, mit einer Deletion der vWFa Domäne ($\Delta vWFa$) oder der PilY-Domäne ($\Delta PilYdom$) exprimieren, verglichen. Die Anzahl der internalisierten Bakterien wurde nach einer ein stündigen Infektion bestimmt, dazu wurden die nicht phagozytierten, extrazellulären Bakterien durch eine Behandlung mit Gentamicin abgetötet. Die Invasionsrate wurde dabei anhand des Inokulums berechnet und prozentual auf die Invasionsrate des Wildtyps bezogen. In Abbildung 6.10 sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Wiederholungen dargestellt.

Hierbei zeigte die $\Delta pilY1$ Deletionsmutante eine signifikant verringerte Invasion, welche 50 % der Invasionsrate des *L. pneumophila* Corby Wildtyps entspricht. Dieser Effekt konnte durch die Expression des nativen PilY1 in dem Stamm WT PilY1 vollständig komplementiert werden. Eine Deletion der PilY-Domäne führte zu einer erneuten signifikanten Reduktion der Invasionsrate. Hingegen hatte die Deletion der vWFa Domäne keine Auswirkungen auf die Invasionsrate. Dies demonstriert, dass *pilY1* zur Invasion von *L. pneumophila* in Amöben, wie *D. discoideum*, trägt und dies vor allem durch eine Funktion der C-terminalen PilY1 Domäne begünstigt wird.

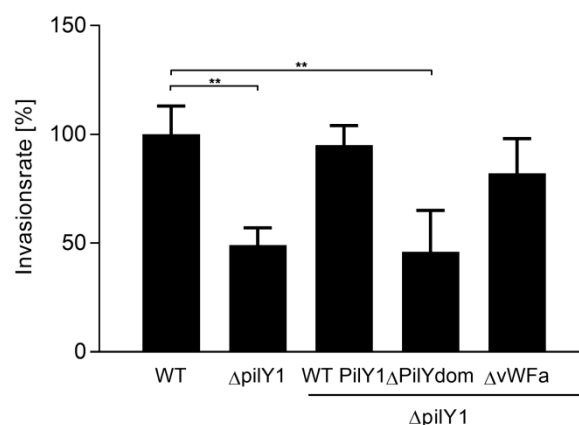


Abbildung 6.10: Invasion der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante in *D. discoideum*. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der Invasions- oder Phagozytoserate der *L. pneumophila* Corby *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$) sowie der *pilY1* Komplementanten WT PilY1, $\Delta pilY1dom$ und $\Delta vWFa$ im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby (WT) aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Wiederholungen. Die Infektion von *D. discoideum* erfolgte für eine Stunde. Zur Kalkulation der Invasionsrate wurden die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch eine Behandlung mit Gentamicin bestimmt und auf das jeweilige Inokulum normiert. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (** $p \leq 0,01$).

6.8.2. Die Adhäsion und Invasion von *L. pneumophila* in humane Makrophagen ist abhängig von PilY1

Um die Beteiligung von *pilY1* auf die Adhäsion und Invasion von *L. pneumophila* Corby innerhalb der Infektion von humanem Lungengewebe zu analysieren, wurden zunächst Adhäsions- und Invasionsexperimente mit der Makrophagenzelllinie THP-1 durchgeführt. Verglichen wurden dazu die Adhäsions- und Invasionsraten des *L. pneumophila* Corby Wildtyps, der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante sowie der *pilY1* Komplementanten WT PilY1 $\Delta vWFa$ und $\Delta PilYdom$. Die Adhäsions- und Invasionsraten wurden dabei anhand des Inokulums berechnet und prozentual auf die jeweilige Rate des Wildtyps bezogen. Zur Analyse des Adhäsionsverhaltens wurde zunächst die Phagozytose der Bakterien durch die Inhibition der Aktinpolymerisierung mit Cytochalasin B unterbunden. Nach einer 30-minütigen Infektion wurde anschließend die Anzahl der adhärenen Bakterien bestimmt. Die Bestimmung der invadierten Bakterien erfolgte nach einer 1-stündigen Infektion, dazu wurden die nicht phagozytierten, extrazellulären Bakterien durch eine Gentamicinbehandlung abgetötet. Ausgewertet wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Wiederholungen, die Ergebnisse sind in Abbildung 6.11 dargestellt.

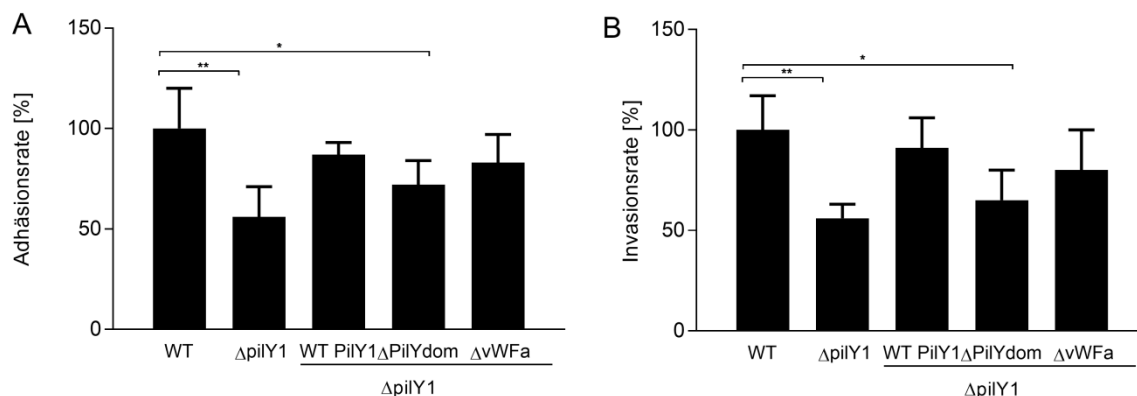


Abbildung 6.11: Adhäsion und Invasion der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante in humane Makrophagen. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der Adhäsions- (A) und Invasionsrate (B) der *L. pneumophila* Corby *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$) sowie der *pilY1* Komplementanten WT PilY1, $\Delta pilY1dom$ und $\Delta vWFa$ im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby (WT) in THP-1 Makrophagen. Ausgewertet wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Wiederholungen. Die Inkubationszeit für das Adhäsionsexperiment betrug 30 Minuten. Zur Kalkulation der Adhäsionsrate wurde die Anzahl der adhärenen Bakterien durch die Inhibition der Phagozytose mit Cytochalasin B ermittelt und auf das Inokulum normiert. Die Inkubationszeit für das Invasionsexperiment betrug 1 Stunde. Zur Berechnung der Invasionsrate wurden die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch eine Behandlung mit Gentamicin bestimmt und auf das jeweilige Inokulum normiert. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

In beiden Experimenten wies die $\Delta pilY1$ Deletionsmutante eine signifikante Reduktion der Adhäsions- als auch der Invasionsrate auf. Im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp kam es nur bei ca. 50 % der $\Delta pilY1$ Bakterien zu einer effizienten Adhäsion bzw. Internalisierung durch die THP-1 Makrophagen. Dieser *pilY1* bedingte Phänotyp ließ sich

durch die Expression des nativen PilY1 vollständig komplementieren. Eine signifikante Komplementation trat ebenfalls bei der Deletion der vWFa Domäne auf. Der Verlust der PilY1 Domäne führte erneut zu einer verringerten Adhäsions- und Invasionsrate. Insbesondere die Invasion war im Vergleich zum Wildtyp um ca. ein Drittel reduziert.

Zur Validierung der Adhäsions- und Invasionsexperimente mit den THP-1 Makrophagen wurden die beobachteten Phänotypen der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante zusätzlich mikroskopisch ausgewertet. Abbildung 6.12 zeigt die Ergebnisse der differenziellen Immunfluoreszenzfärbung, angegeben sind jeweils die adhärenenten und internalisierten Bakterien pro Zelle.

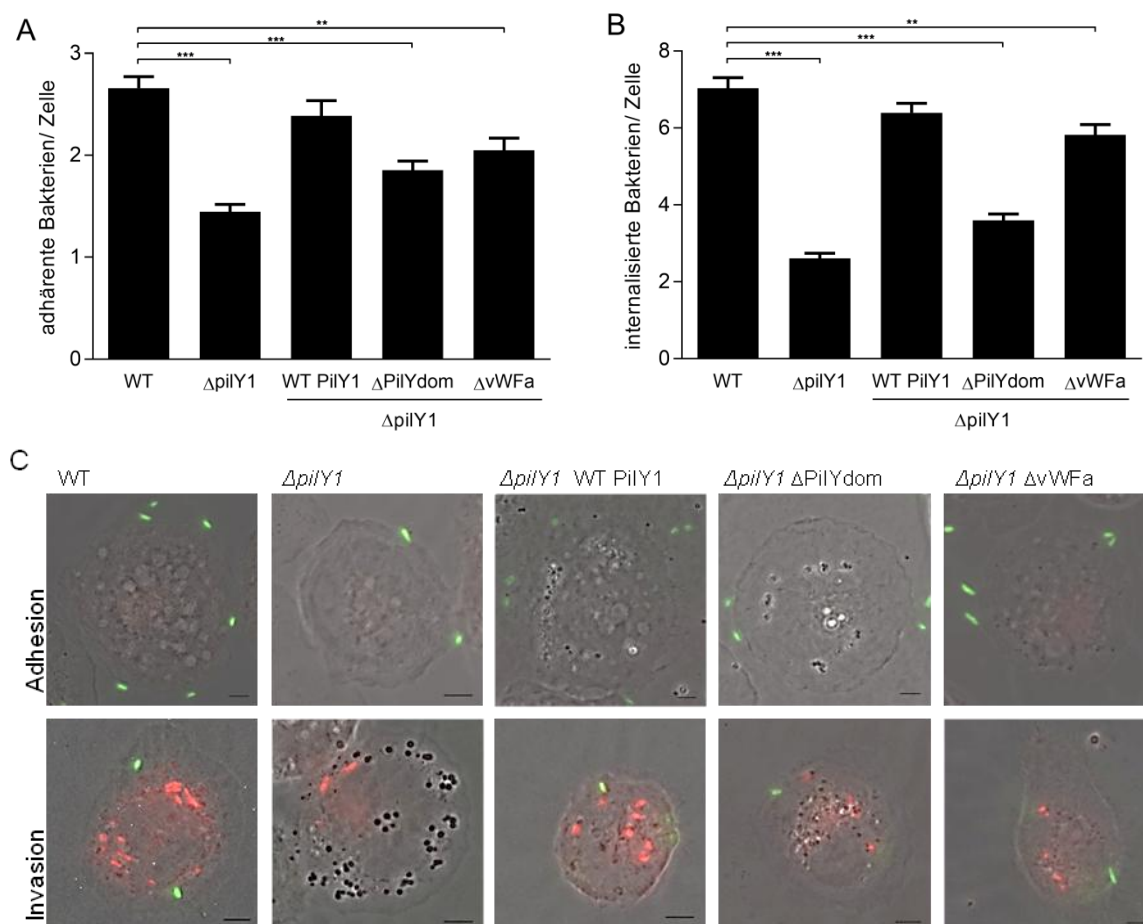


Abbildung 6.12: Mikroskopische Validierung der Adhäsion und Invasion der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante in THP-1 Makrophagen. (A) Quantifizierung der adhärenenten und internalisierten Bakterien pro Wirtszelle, nach der Infektion der THP-1 Makrophagen mit dem *L. pneumophila* Corby (WT), der *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$) sowie der *pilY1* Komplementanten WT PilY1, $\Delta pilY1dom$ und $\Delta vWFa$. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Auszählen der jeweiligen Bakterien nach der differenziellen Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-*L. pneumophila* Antikörper sowie den Alexa 488 und Alexa 568 konjugierten Sekundärantikörpern. Ausgezählt wurden jeweils die adhärenenten und internalisierten Bakterien von jeweils 300 Makrophagen aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (B) Repräsentative Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der adhärenenten (grün) und internalisierten (rot) Bakterien. Maßstab = 1 μm .

Dazu wurde im Anschluss an die Adhäsions- und Invasionsexperimente eine differenzielle Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-*L. pneumophila* Antikörper sowie den Alexa 488 und Alexa 568 konjugierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Durch die differenzierte Färbung ist eine Unterscheidung der adhärenenten Bakterien in grün, und der internalisierten Bakterien in rot möglich. Zur Quantifizierung wurden die adhärenenten und internalisierten Bakterien, des *L. pneumophila* Corby Wildtyps, der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante sowie der *pilY1* Komplementanten WT PilY1 $\Delta vWFa$ und $\Delta PilYdom$, von insgesamt 300 Makrophagen ausgezählt.

Eine signifikante Verringerungen der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante in der Adhäsion und Invasion lies sich auch in der mikroskopischen Quantifizierung beobachten. So adhärerten im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp nur halb so viele Bakterien an dem Makrophagen und es wurde nur ca. ein Drittel internalisiert. Generell konnte bei einem Großteil der THP-1 Makrophagen eine Interaktion mit der $\Delta pilY1$ Mutanten beobachten werden. Jedoch konnte in den Komplementationsversuchen nur durch die Expression des nativen PilY1 eine effiziente Adhäsion und Invasion wiederhergestellt werden. Eine Deletion der vWFa Domäne und PilY1 Domäne verursachte ebenfalls eine signifikante Reduktion der adhärenenten sowie internalisierten Bakterien. Zusammenfassend scheint *pilY1* an der Adhäsion an Makrophagen beteiligt zu sein. Diese Interaktion könnte vor allem in der Funktion der C-terminalen PilY1 Domäne begründet sein. Ferner könnte die verminderte Invasion aus einer verschlechterten Adhäsion resultieren.

6.8.3. Die Adhäsion und Invasion von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen ist abhängig von PilY1

Zur Untersuchung des Adhäsions- und Invasionsverhaltens der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Deletionsmutante in nicht professionelle Phagozyten wurden weitere Bindungs- und Infektionsversuche mit den humanen Lungenepithelzellen der Zelllinie A549 durchgeführt. Die Adhäsions- und Invasionsraten des *L. pneumophila* Corby Wildtyps, der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante sowie der *pilY1* Komplementanten WT PilY1 $\Delta vWFa$ und $\Delta PilYdom$ wurden anhand des Inokulums berechnet und prozentual auf die jeweilige Rate des Wildtyps bezogen. Nach 1 Stunde Infektion wurde anschließend die Anzahl der adhärenenten Bakterien bestimmt. Dazu wurde im Vorfeld die Phagozytose der Bakterien durch die Inhibition der Aktinpolymerisierung mit Cytochalasin B unterbunden. Die Bestimmung der invadierten Bakterien erfolgte nach einer 2-stündigen Infektion, nachdem die nicht phagozytierten, extrazellulären Bakterien durch Gentamicin abgetötet wurden. Ausgewertet wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Wiederholungen, die Ergebnisse sind Abbildung 6.13 dargestellt.

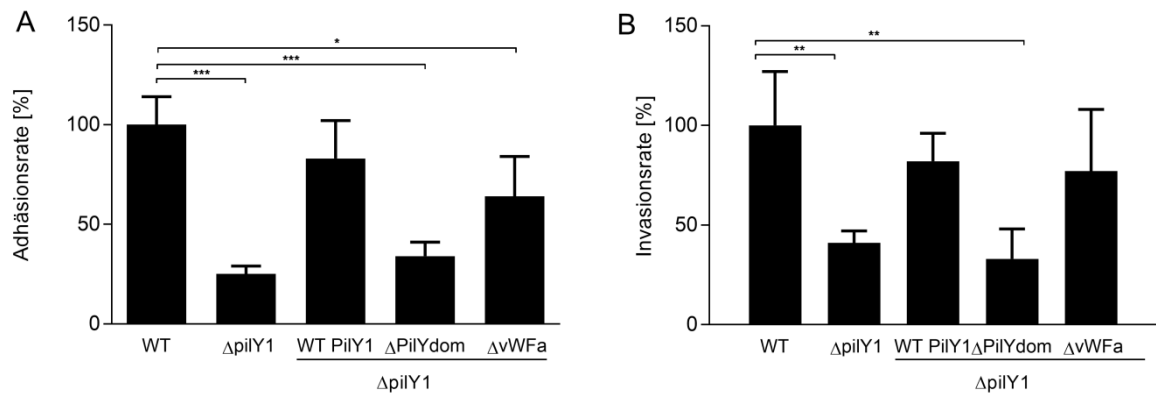


Abbildung 6.13: Adhäsion und Invasion der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante in humane Lungenepithelzellen. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der Adhäsions- (A) und Invasionsrate (B) der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Deletionsmutante ($\Delta pilY1$) sowie der $\Delta pilY1$ Komplementanten WT PilY1, $\Delta pilY1 dom$ und $\Delta vWFa$ im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby (WT) in A549 Epithelzellen. Ausgewertet wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Wiederholungen. Die Inkubationszeit für das Adhäsionsexperiment betrug 1 Stunde. Zur Kalkulation der Adhäsionsrate wurde die Anzahl der adhärenen Bakterien durch die Inhibition der Phagozytose mit Cytochalasin B ermittelt und auf das Inokulum normiert. Die Inkubationszeit für das Invasionsexperiment betrug 2 Stunden. Zur Berechnung der Invasionsrate wurden die Anzahl der intrazellulären Bakterien durch eine Behandlung mit Gentamicin bestimmt und auf das jeweilige Inokulum normiert. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Auch in den nicht-professionell phagozytierenden A549 Epithelzellen ließ sich eine signifikant verringerte Adhäsions- und Invasionsrate der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante beobachten. Dieser Effekt war mit einer Reduktion der Adhäsion und Invasion von mehr als 60-70 % im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp wesentlich stärker ausgeprägt als bei dem getesteten THP-1 Makrophagen und Amöben. Dieser Phänotyp konnte durch die Expression des nativen PilY1 in dem Stamm WT PilY1 vollständig komplementiert werden. Eine Deletion der PilY-Domäne führte zu einer erneuten signifikanten Reduktion der Adhäsion und Invasion. Die Deletion der vWFa Domäne verursachte eine Verringerung der Adhäsion um ca. 40 % und hatte hingegen keine signifikanten Auswirkungen auf die Invasion. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass $\Delta pilY1$ ebenfalls zur Adhäsion und Invasion von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen beiträgt, und dies unter anderem durch eine Funktion der C-terminalen PilY1 Domäne beeinflusst werden könnte.

6.9. PilY1 ist an der Oberflächentranslokation von *L. pneumophila* beteiligt

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der bakteriellen Pathogenese ist die Translokation über Oberflächen wie zum Beispiel mukosale Epithelien. Dies ermöglicht unter anderem die Kolonisierung und Migration innerhalb des infizierten Gewebes sowie die Adhäsion an Zielzellen und trägt zu Biofilmbildung bei (Alarcon *et al.*, 2009; Kearns, 2010; Taylor and Buckling, 2011; Burrows, 2012). Für *L. pneumophila* sind zwei verschiedene Formen der Oberflächentranslokation beschrieben. Dies ist zum einen Twitching Motility, eine Typ IV Pilus-vermittelte Bewegungsform und zum Anderen eine Translokation bedingt durch die

Sekretion eines Tensidfilms, genannt Sliding Motility (Stewart *et al.*, 2009; Coil and Anné, 2009).

6.9.1. PilY1 beeinflusst die Oberflächenbewegung „Twitching Motility“

Twitching Motility ist eine zielgerichtete Bewegungsform Gram negativer Bakterien über feste und halbfeste Oberflächen, hervorgerufen durch die Polymerisation und Depolymerisation von Typ IV Pili. Durch die Interaktion des Pilus mit entsprechenden Oberflächen oder Substraten und der anschließenden Depolymerisation entstehen Zugkräfte, welche in die Bewegung des Bakteriums übertragen werden. Dieser Mechanismus spielt neben der Motilität ebenfalls in der Zelladhäsion und Biofilmbildung eine Rolle (Merz *et al.*, 2000; Skerker and Berg, 2001; Mattick, 2002; Coil and Anné, 2009). Da das *L. pneumophila pilY1* als möglicher Faktor der Typ IV Pilus-Biogenese annotiert ist, sollte der Einfluss von *pilY1* auf die Twitching Motility Aktivität von *L. pneumophila* Corby untersucht werden. Hierzu wurden der *L. pneumophila* Corby Wildtyp, die $\Delta pilY1$ Deletionsmutante und die *pilY1* Komplementanten, welche das native PilY1 (WT PilY1) sowie die verkürzten Formen, mit einer Deletion der vWFa Domäne ($\Delta vWFa$) oder der PilY-Domäne ($\Delta PilYdom$) exprimieren, verglichen.

Zur Analyse wurden stationäre Kulturen auf BCYE-Platten mit 1,6 % Agar getropft und über 14 Tage bei 30 °C kultiviert. Anschließend wurden die Platten fotografiert und die Fläche des durch Twitching Motility entstandenen Schwärmsaums um die Kolonie durch Bestimmung der Pixel im Verhältnis zur Fläche der Agarplatte berechnet. Quantifiziert wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Wiederholungen, die Ergebnisse sind in Abbildung 6.14 dargestellt.

Der Schwärmsaum der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante ist im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp um ca. die Hälfte reduziert und weist somit eine signifikant verringerte Twitching Motility auf. Die Expression des nativen PilY sowie die Deletion der vWFa Domäne konnten die Twitching Motility Aktivität der $\Delta pilY1$ Mutante vollständig komplementieren. Hingegen resultierte die Deletion der PilY-Domäne in einer signifikanten Reduktion der Motilität. So entsprach die Twitching Motility des $\Delta vWFa$ Komplementationsstamms nur noch ca. zweidrittel der Wildtyp Translokation. Darüber hinaus weist die $\Delta pilY1$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Koloniemorphologie auf. Im direkten Vergleich fällt auf, dass die Kolonieabgrenzungen des Wildtyps leicht ausfransen und eine gelappte Form aufweisen. Hier tritt ein zonenförmiges Wachstum auf, sodass hier die Twitching Motility bedingte Bewegung, strahlenförmig vom zentralen Ring der Kolonie ausgehend stattfindet. Die $\Delta pilY1$ Mutante weist dagegen eine sehr einheitliche, unstrukturierte und glatte Oberfläche des Schwärmsaumes aus. Dieser Unterschied könnte auf eine verringerte Motilität zurückzuführen sein, da sich weniger Bakterien trotz des

Nährstoffmangels aus dem zentralen inokulierten Bereich entfernen. Abschließend konnte gezeigt werden, dass *pilY1* an der Typ IV Pili abhängigen Twitching Motility beteiligt ist und diese Funktion maßgeblich durch die C-terminalen PilY-Domäne vermittelt wird.

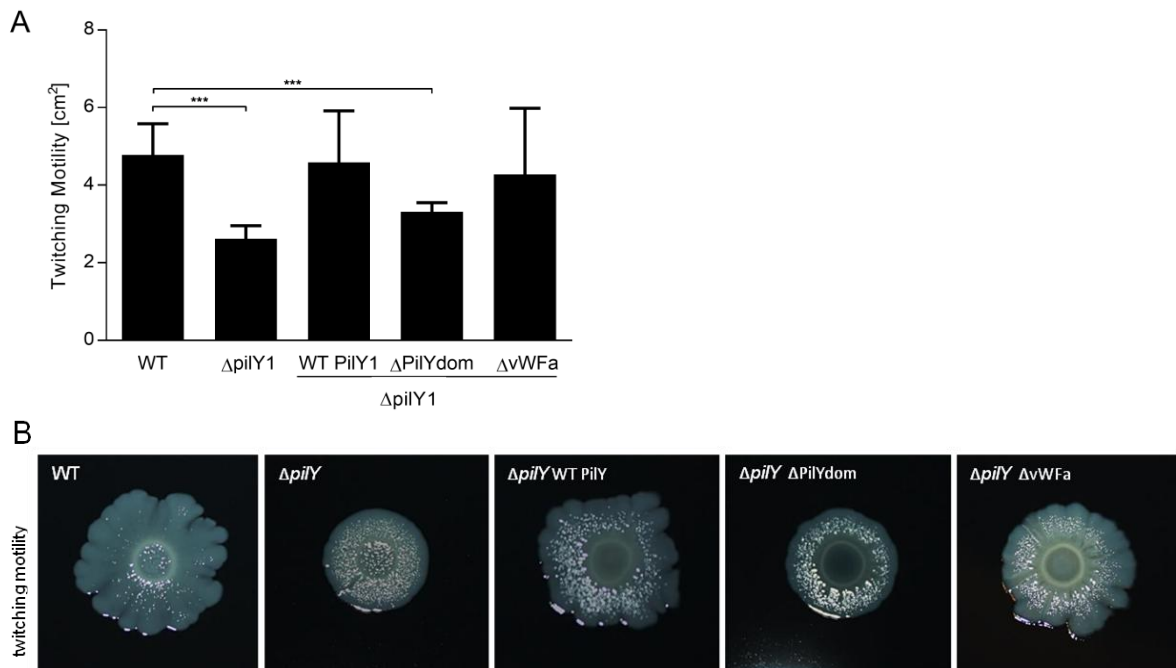


Abbildung 6.14: Twitching Motility der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante. Gezeigt ist die durch Twitching Motility vermittelte Zellmotilität des *L. pneumophila* Corby (WT) der *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$) sowie der *pilY1* Komplementanten WT PilY1, $\Delta pilY1$ dom und $\Delta vWFa$. Für das Experiment wurden 20 μ l einer stationären Flüssigkultur auf eine BCYE-Platte mit 1,6 % Agar getropft und für 14 Tage bei 30 °C inkubiert. (A) Quantifizierung der durch Twitching Motility migrierten Zone. Dazu wurden die Platten photographisch dokumentiert und die Flächen von Kolonien durch Bestimmung der Pixel und Umrechnung auf die Fläche der Agarplatte berechnet. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit jeweils 3 Wiederholungen. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (**p ≤ 0,001). (B) Repräsentative Aufnahmen der beobachteten Kolonien. Der zentrale Ring entspricht den inokulierten Bakterien, der äußere Ring ist der durch Twitching Motility entstandene Schwärmsaum.

6.9.2. PilY1 beeinflusst die Oberflächenbewegung „Sliding Motility“

Sliding Motility ist hingegen eine nicht zielgerichtete bakterielle Oberflächentranslokation, welche unabhängig von Pili oder Flagellen ist. Die Bewegung erfolgt viel mehr durch eine passive Ausbreitung der wachsenden Kolonie auf einem sezernierten Tensidfilm. Diese Tensidfilme bestehen vorrangig aus amphiphatischen Verbindungen und dienen der Reduzierung der Oberflächenspannung zwischen Bakterium und Substrat. Diese Tensid-Sekretion wird bei *L. pneumophila* durch das Typ I und Typ II Sekretionssystem vermittelt. (Murray and Kazmierczak, 2008; Stewart *et al.*, 2009; Be'er *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2011).

Um den Einfluss von *pilY1* auf das Sliding Motility Verhalten und die Tensid-Sekretion von *L. pneumophila* Corby zu analysieren, wurden stationäre Kulturen auf BCYE-Platten mit 0,5 % Agar getropft und über 14 Tage bei 30 °C kultiviert. Hierzu wurde die Motilität des

L. pneumophila Corby Wildtyps, der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante sowie der *pilY1* Komplementanten WT *PilY1* $\Delta vWFa$ und $\Delta PilYdom$ verglichen. Quantifiziert wurde die Sliding Motility bzw. die Fläche der migrierten Zone. Die Berechnung erfolgte durch die Bestimmung der Pixel im Verhältnis zur Fläche der Agarplatte. Zur Auswertung wurden die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Wiederholungen verwendet, die Ergebnisse sind in Abbildung 6.15 dargestellt.

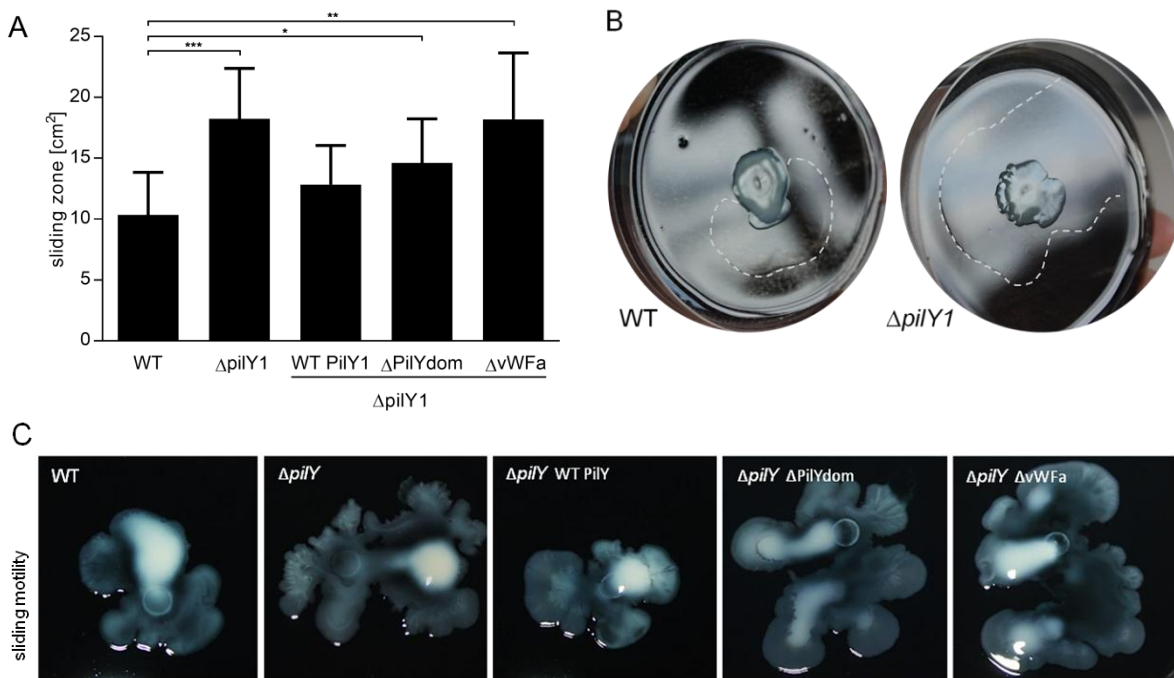


Abbildung 6.15: Sliding Motility der *L. pneumophila* Corby $\Delta pilY1$ Mutante. Gezeigt ist die durch Sliding Motility vermittelte Zellmotilität des *L. pneumophila* Corby (WT), der *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$) sowie der *pilY1* Komplementanten WT *PilY1*, $\Delta pilY1dom$ und $\Delta vWFa$. Für das Experiment wurden 20 μ l einer stationären Flüssigkultur auf eine BCYE-Platte mit 0,5 % Agar getropft und für 14 Tage bei 30 °C inkubiert. (A) Quantifizierung der durch Sliding Motility migrierten Zone. Dazu wurden die Platten fotografisch dokumentiert und die Flächen von Kolonien durch Bestimmung der Pixel und Umrechnung auf die Fläche der Agarplatte berechnet. Dieses Ergebnis ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente mit jeweils 3 Wiederholungen. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen Student's *t*-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 % errechnet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). (B) Repräsentative Aufnahmen der beobachteten Tensidfilme des *L. pneumophila* Corby (WT) und der *pilY1* Deletionsmutante ($\Delta pilY1$) nach 7 Tagen Inkubation bei 30 °C. (C) Repräsentative Aufnahmen der beobachteten Kolonien 14 Tagen Inkubation bei 30 °C. Der zentrale Ring entspricht den inokulierten Bakterien, der äußere Ring ist der durch Sliding Motility entstandene Schwärmsaum.

Gegensätzlich zu den Ergebnissen in den Twitching Motility Experimenten zeigte die $\Delta pilY1$ Deletionsmutante eine signifikant erhöhte Sliding Motility. So ist die migrierte Fläche der $\Delta pilY1$ Mutante um mehr als ein Drittel größer, als die des *L. pneumophila* Corby Wildtyps. Außerdem war bei der $\Delta pilY1$ Mutante schon nach der Hälfte der Inkubationszeit eine vermehrte Sekretion des Tensidfilms zu beobachten, welcher im Gegensatz zum Wildtyp am Ende der Inkubationszeit die gesamte Agarplatte einnahm. Die Komplementationsexperimente zeigten, dass im Gegensatz zu den verkürzten Formen, nur

die Expression des nativen PilY1 zur vollständigen Wiederherstellung der Wildtyp Translokation führte. Der Δ PilYdom zeigte eine verringerte Sliding Motility, die Motilität des Δ vWFa Stammes entsprach hingegen der Δ *pilY1* Mutante. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass *pilY1* ebenfalls an der Pilus unabhängigen Translokation beteiligt, was wahrscheinlich auf die vermehrte Tensidbildung zurückzuführen ist.

6.10. Calciumbindung des *L. pneumophila* PilY1 Proteins

Obwohl Calciuminteraktionen vorwiegend in Eukaryoten studiert werden, konnten durch Sequenzanalysen, auch in Prokaryoten, immer mehr Calciumbindepoteine identifiziert werden (Domínguez *et al.*, 2015). Diese verfügen zudem über strukturell homologe eukaryotische Ca^{2+} -Bindungsmotive, dazu gehören unter anderem helix-loop-helix EF-hand like Domänen oder Calmodulin ähnliche Motive (Yang, 2001; Rigden *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006). Diese Ca^{2+} -Bindungsproteine beeinflussen in Bakterien wahrscheinlich zahlreiche physiologische Prozesse, wie die Differenzierung, Sekretion, Chemotaxis und Virulenz (Sarkisova *et al.*, 2005; Korotkov *et al.*, 2009; Guragain *et al.*, 2013; Domínguez *et al.*, 2015). In den homologen PilY1 und PilC Proteinen von *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *K. kingae* und *X. fastidiosa* konnte bereits eine regulatorische Ca^{2+} -Bindedomäne identifiziert werden (Orans *et al.*, 2010; Porsch *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2014). Eine mögliche Ca^{2+} -Interaktion der *L. pneumophila* PilY1 Domäne sollte aus diesem Grund untersucht werden. Die strukturelle Analyse von PilY1 sowie die rekombinante Expression erfolgte in Kooperation mit Dr. Jörn Krause am Helmholtz Zentrum Infektionsforschung in Braunschweig.

6.10.1. Struktur der putativen Ca^{2+} -Bindungsdomäne des *L. pneumophila* PilY1

Zur Analyse eines möglichen Ca^{2+} -Bindungsmotivs der *L. pneumophila* PilY1 Domäne wurde zunächst ein Alignment der Aminosäuresequenzen der Stämme aus *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* und *K. kingae* durchgeführt. Jedoch konnte hier keine hinreichende Übereinstimmung festgestellt werden. Ein Strukturmodell der *L. pneumophila* PilY1 Domäne, erstellt durch molekularen Ersatz, anhand der identifizierten Proteinstruktur der PilY1 Domäne von *P. aeruginosa* zeigte hingegen große strukturelle Übereinstimmungen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.16 dargestellt.

Das *P. aeruginosa* PilY1 weist einen Ca^{2+} -Bindungs-Loop auf, welcher eine große Ähnlichkeit zu den EF-hand like Domänen zeigt. Dieser Loop umfasst 9 Aminosäuren. Koordiniert wird das Calciumion dabei von drei Asparaginsäureresten (D851, D855 und D859), einer Asparagin Seitenkette (N853) und einem Valin (V857). Die *L. pneumophila* PilY1 Domäne scheint über einen strukturell vergleichbaren Ca^{2+} -Bindungs-Loop zu verfügen. Jedoch würde dieser nur von 8 Aminosäuren gebildet werden. Darüber hinaus

wird hier das Calciumion von den Aminosäuren Glutamin (Q892 und Q897) sowie von zwei Asparaginsäureresten (D894 und D899) und der Aminosäure Prolin (P900) koordiniert.

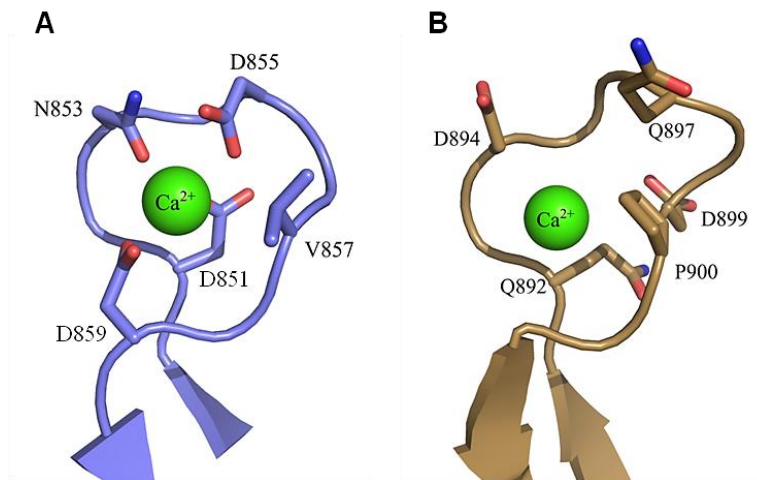


Abbildung 6.16: Putative Ca^{2+} -Bindungsdomäne von *L. pneumophila* PilY1. Dargestellt ist ein Vergleich der Ca^{2+} -Bindungsdomäne des *P. aeruginosa* PilY1 (A) und der putativen Bindungsdomäne von *L. pneumophila* (B). Die Ca^{2+} -Bindungsdomäne wurde mittels des molekularen Ersatz Verfahrens anhand der bekannten Struktur von *P. aeruginosa* modelliert. Der Ca^{2+} -Bindungs-Loop von *P. aeruginosa* umfasst 9 Aminosäuren. Koordiniert wird das Calciumion von drei Asparaginsäureresten (D851, D855 und D859), einer Asparagin Seitenkette (N853) und einem Valin (V857). Der putative *L. pneumophila* Ca^{2+} -Bindungs-Loop wird von 8 Aminosäuren gebildet. Das Calciumion wird von den Aminosäuren Glutamin (Q892 und Q897) sowie von zwei Asparaginsäureresten (D894 und D899) und der Aminosäure Prolin (P900) koordiniert.

6.10.2. Rekombinante Produktion der *L. pneumophila* PilY-Domäne

Für die Charakterisierung der Ca^{2+} -Interaktion der *L. pneumophila* Corby PilY1 Domäne (aa 588-1169) sollte diese rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Für die rekombinante Expression wurden verschiedene Systeme ausprobiert.

Hierzu wurden zunächst Systeme für die Streptavidin-Affinitäts-Chromatographie getestet. Jedoch wies die 61 kDa große PilY1 Domäne bei der Expression mit dem pASK-Iba7 System und der Reinigung mittels des N-terminalen *Strep*[®]-tags eine sehr geringe Löslichkeit auf. Zudem wurde das Protein während der Produktion in *E. coli* Rosetta Gami-2 (DE3) in Inklusionskörpern eingelagert. Gleiches gilt für die Expression und Reinigung mit einem C-terminalen *Strep*[®]-tags II aus dem pETTSC System. Auch die Expression des kompletten PilY1 Proteins konnte die Faltungseigenschaften und die Löslichkeit nicht verbessern. Daraus resultierend erfolgte die rekombinante Expression mittels des pvp008ZZ Vektors. Diese ermöglichte eine Nickel-Chelat-Chromatographie durch den C-terminalen Double ZZ tag. Der 17 kDa große ZZ tag wurde im Anschluss mit der TEV Protease entfernt. Aufgrund der geringen Reinheit des Proteins wurden zusätzlich eine Anionenaustauschchromatographie sowie eine Gelfiltration durchgeführt. Bei den Verunreinigungen handelt es sich vermutlich um Chaperon-Proteine des Produktionsstammes. Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte sind in der Abbildung 6.17 dargestellt. Die Elutionsfraktionen wurden im Anschluss an die Gelfiltration

vereinigt und aufkonzentriert. Für die Ca^{2+} -Interaktionsstudien wurde das PilY1 Protein zusätzlich mit einem Chelator von etwaigen Calciumionen befreit. Generell war die Ausbeute der rekombinanten PilY1 Produktion relativ gering und somit limitierend für die anschließende biochemische Charakterisierung.

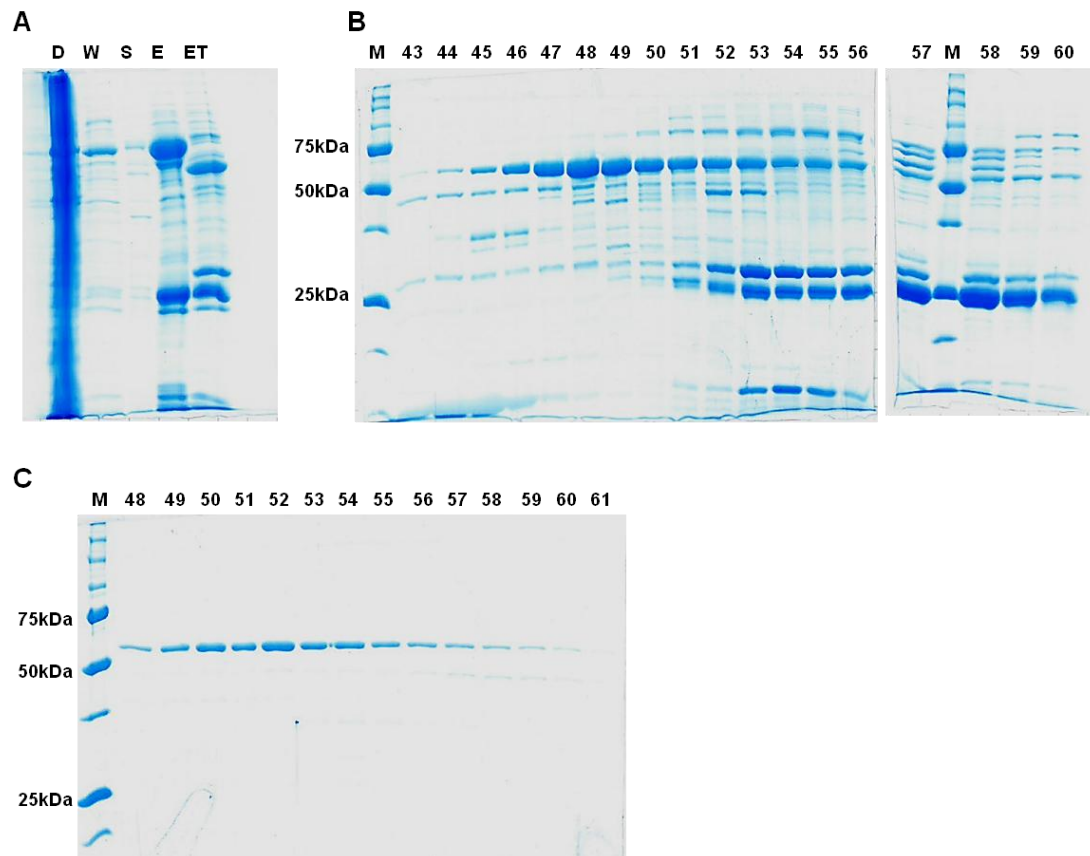


Abbildung 6.17: Aufreinigungsschritte der rekombinanten *L. pneumophila* Corby PilY1 Domäne. Dargestellt sind Wasch und Elutionsfraktionen (D: Durchflussfraktion, W: Waschfraktion, S: Sepharose, E: Elution mit 300 mM Imidazol, ET: Elutionsfraktion nach dem Verdau mit 2 mg TEV Protease) nach der Nickel-Chelat-Chromatographie mit einer Ni-NTA Säule (A). Die Elutionsfraktionen der anschließenden Anionenaustauschchromatographie mit der MonoQ 10/100 Säule (B) sowie der Gelfiltration mit der Superdex 200 16/600 Säule (C). Als Größenstandart wurde der Precision Plus Protein™ Unstained Standard verwendet. Die PilY1 Domäne hat eine Größe von 61 kDa und der Double ZZ tag verfügt über eine Größe von 17 kDa. Die Fraktionen 48-56 nach der Gelfiltration wurden gepoolt und für weitere Experimente aufkonzentriert.

6.10.3. Die Ca^{2+} -Interaktion der *L. pneumophila* PilY1 Domäne

Die Ca^{2+} -Interaktion der *L. pneumophila* PilY1 Domäne wurde durch eine Microscale Thermophorese bestimmt. Die Microscale Thermophorese (MST) ermöglicht die quantitative Analyse von molekularen Interaktionen in Lösung mit kleinsten Volumina, hoher Sensitivität und unter nahezu nativen Bedingungen. Das Messprinzip beruht dabei auf der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten. Dieser physikalische Effekt wird als Thermophorese bezeichnet. Die Thermophorese einzelner Moleküle ist abhängig von ihrer molekularen Größe, ihrer Ladung sowie ihrer Hydrathülle. Da sich mindestens einer dieser Parameter durch eine Bindung zwischen einem Protein

und einem Liganden verändert, muss auch die Thermophorese des gebildeten Komplexes unterschiedlich zu der Thermophorese der Einzelmoleküle sein. Die Thermophorese wird nach lokaler Erhitzung durch einen Infrarotlaser optisch erfasst. Veränderungen im Thermophorese-Verhalten bei Titration mit einem unmarkierten Interaktionspartner erlauben es, die Bindungsparameter quantitativ zu bestimmen. Um die Ca^{2+} -Bindungsaffinität der PilY1 Domäne zu messen, wurde eine Verdünnungsreihe mit CaCl_2 in den Konzentrationen 100 μM bis 3 nM hergestellt, während die Konzentration des fluoreszenzmarkierten PilY1 Proteins konstant blieb (Wienken *et al.*, 2010; Weinert *et al.*, 2011; Jerabek-Willemsen *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2015).

Die Ergebnisse der MST-Messungen sind in Abbildung 6.18 gezeigt. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität während des Thermophoresesperiments mit verschiedenen CaCl_2 Konzentrationen. Das vorangehende Plateau zeigt das basale Fluoreszenzsignal und entspricht der unbeeinflussten Diffusion der markierten Moleküle. Im Anschluss zeigt sich die Verteilung der Moleküle nach dem Erhitzen durch den Infrarotlaser, der eigentliche Thermophoreseprozess findet statt. Eine Interaktion der PilY1 Domäne mit den Calciumionen müsste somit zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität bei den verschiedenen CaCl_2 Konzentrationen führen. Dies ist jedoch nicht zu beobachten, da alle gemessenen Thermophorese-Kurven den gleichen Verlauf bzw. die gleiche Verteilung der Fluoreszenzintensität aufweisen. Somit konnte keine Ca_{2+} -Bindung der *L. pneumophila* PilY1 Domäne detektiert werden.

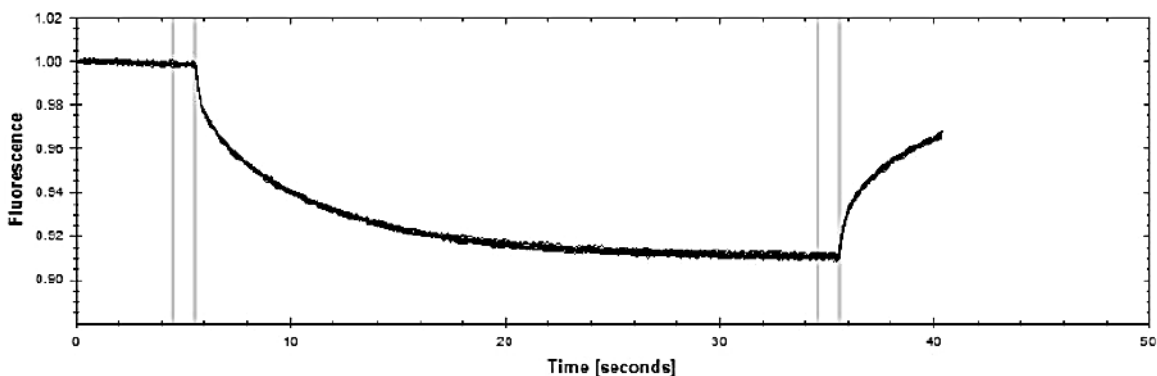


Abbildung 6.18: Microscale Thermophorese (MST) der Ca_{2+} -Interaktion von PilY1. Gezeigt ist die Thermophorese der fluoreszenzmarkierten markierten PilY1 Domäne (aa 588-1169) mit den Calciumionen in den Konzentrationen 100 μM bis 3 nM. Dargestellt die Fluoreszenzintensität über die Zeit während es Thermophoresesperiments bei verschiedenen CaCl_2 Konzentrationen. Das vorangehende Plateau der Fluoreszenzintensität zeigt die unbeeinflusste Diffusion der markierten Moleküle. Im Anschluss zeigt sich die Verteilung der Moleküle bzw. der Fluoreszenzintensität nach dem Erhitzen durch den Infrarotlaser, die eigentliche Thermophorese findet statt. Es konnte keine Ca_{2+} -Bindung der *L. pneumophila* PilY1 Domäne detektiert werden.

7. Diskussion

L. pneumophila ist als fakultativ intrazelluläres Bakterium in der Lage innerhalb einer Vielzahl von eukaryotischen Zellen zu replizieren. Im Rahmen der humanen Lungeninfektion vermehrt sich *L. pneumophila* vorwiegend in alveolaren Makrophagen, kann aber auch in einer Reihe anderer humaner Zellen überleben. In der Umwelt stellen hingegen Protozoen die primären Wirtszellen von *L. pneumophila* dar. Eine effiziente Phagozytose und Interaktion mit der Wirtszelle gilt hierbei als kritischer Mechanismus für die erfolgreiche Etablierung der intrazellulären Infektion. Die Initiation einer solchen Infektion lässt sich weiterhin in die Identifizierung einer geeigneten Wirtszelle, die Adhäsion und Zell-Zellinteraktion sowie die eigentliche Internalisierung und das anschließende intrazelluläre Überleben untergliedern. Jedoch ist die Bedeutung der einzelnen Prozesse für die Pathogenität von *L. pneumophila* weitgehend unbekannt (Samrakandi *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte PilY1 als neuer Oberflächenvirulenzfaktor identifiziert werden, welcher in das komplexe Zusammenspiel zur Initiation einer *L. pneumophila* Infektion involviert ist.

7.1. PilY1 ist ein neuer Virulenzfaktor von *L. pneumophila*

Das *L. pneumophila pilY1* ist annotiert als Faktor der Typ IV Pilus-Biogenese und als PilY1 ähnliches Protein. PilY1-homologe Proteine sind konserviert bei zahlreichen Gamma- und Beta- Proteobakterien, dazu zählen insbesondere Pathogene mit einem breiten Wirtsspektrum (Rahman *et al.*, 1997; Morand *et al.*, 2001; Morand *et al.*, 2004; Kehl-Fie *et al.*, 2008; Siryaporn *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2015). Die bioinformatische Analyse bezüglich homologer konservierter Domänen des Proteins zeigte, dass das *L. pneumophila* PilY1 Homologien zu dem PilY1 von *P. aeruginosa* sowie zu den PilC Proteinen von *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* und *K. kingae* aufweist, wobei die größte Homologie zu *P. aeruginosa* besteht (Marchler-Bauer *et al.*, 2009; Sievers *et al.*, 2011; Finn *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). Überdies sind homologe PilY1 Proteine auch in dem phytopathogenen Stamm *X. fastidiosa* und dem Rhizobakterium *V. paradoxus* identifiziert worden (siehe Abbildung 7.1).

In allen Spezies steht das homologe PilY1 oder PilC1 als Virulenzfaktor in Zusammenhang mit der Zielzell-Interaktion bzw. Adhäsion und bakterieller Motilität. Auffällig ist jedoch, dass es sich mit Ausnahme von *L. pneumophila* ausschließlich um extrazelluläre Pathogene handelt, welche vermittelt durch Typ IV Pili Epithelien und Biofilme besiedeln. So ist *P. aeruginosa* als opportunistisches Pathogen sowohl ein signifikanter Faktor im Bereich der nosokomialen Infektionen, als auch in der chronischen Persistenz von Cystischen Fibrose Patienten. Dabei ist die Adhärenz und Kolonisierung, unter anderem durch Typ IV

Pili, von zentraler Bedeutung bei der Etablierung einer Infektion (Tang *et al.*, 1995; Klausen *et al.*, 2003; Trautmann *et al.*, 2005; Gómez and Prince, 2007).

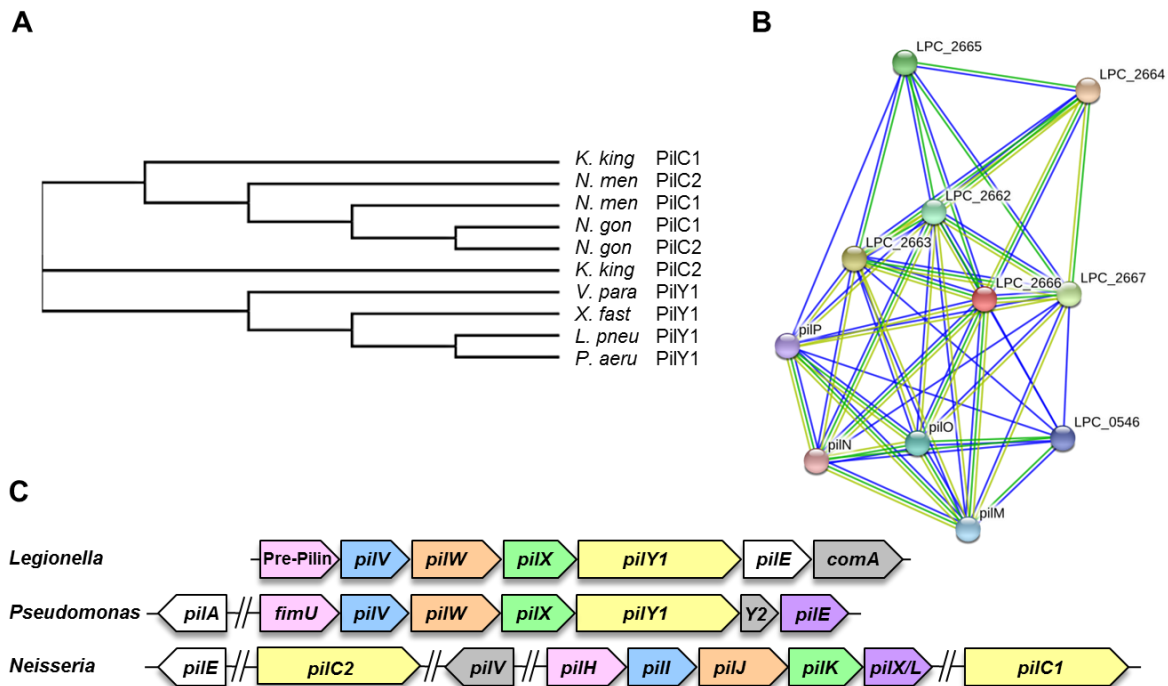


Abbildung 7.1: Homologie-Abgleich des *L. pneumophila* PilY1. (A) Phylogramm der homologen PilY Proteine der Stämme *L. pneumophila* Corby, *P. aeruginosa*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *K. kingae*, *V. paradoxus* und *X. fastidiosa*. Das Phylogramm wurde durch ein Sequenzalignement mit dem Programm Clustal Omega (multiple sequence alignment Programm) von EMBL-EBI durchgeführt. (B) Analyse der Protein-Protein Interaktionen des *L. pneumophila* PilY1 mit dem Programm STRING 9.1 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins). Das Netzwerk zeigt potentielle Interaktionen von PilY1, wobei die grünen Verbindungslinien auf eine Interaktionsevidenz, begründet durch einen vergleichbaren genomischen Kontext (Neighborhood), hinweist. Verbindungslinien in blau und gelb signalisieren eine potenzielle Interaktion aufgrund des funktionellen Kontextes (co-occurrence) bzw. sind in diesem Zusammenhang bereits beschrieben worden (text-mining evidence). LPC_0546 (signal peptidase); LPC_2360 (PilP, pilus biosynthesis protein); LPC_2361 (PilO, pilus assembly protein); LPC_2362 (PilN, type IV pilus biogenesis protein); LPC_2363 (PilM, type IV pilus biogenesis protein); LPC_2662 (type IV pre-pilin); LPC_2663 (PilV, type IV pilus modification protein); LPC_2664 (PilW, pilus assembly protein); LPC_2665 (PilX, pilus assembly protein); LPC_2666 (PilY1, type IV fimbrial biogenesis); LPC_2667 (PilE, type IV pilin) (Franceschini *et al.*, 2013; Szklarczyk *et al.*, 2015). (C) Vergleich der Operonstruktur der Pilin-ähnlichen Komponenten in *L. pneumophila*. Dargestellt ist die genomische Organisation der Pilin und Pilin-ähnlichen Gene für die Typ IV Pili von *L. pneumophila*, *P. aeruginosa* und pathogenen *Neisseria* spp.. Homologe Komponenten sind durch eine einheitliche Farbe gekennzeichnet. Die Pilin-Untereinheit ist in Weiß dargestellt und Komponenten ohne homologe Entsprechung sind in grau gekennzeichnet. Die Symbole || beschreiben eine Unterbrechung im Genom. Ein Vergleich der Operonstruktur zwischen *P. aeruginosa* und *Neisseria* spp wurde von Nguyen *et al.*, 2015 durchgeführt.

Die eng verwandten Spezies *N. meningitidis* und *N. gonorrhoeae* besiedeln ebenfalls mukosale Epithelien des Menschen. Entscheidend für die erfolgreiche Kolonisierung ist die Typ IV Pilus-vermittelte Adhäsion und Mikrokoloniebildung an die Zielzellen. *N. meningitidis* besiedelt als fakultativer Kommensale den Nasopharynx. Gelangen die Bakterien in den Blutstrom, können Sie ebenfalls die Blut-Hirn-Schranke überwinden und so eine Meningitis sowie Sepsis auslösen. *N. gonorrhoeae* infiziert hingegen den Urogenitaltrakt des Menschen und ist der Verursacher der sexuell übertragbaren Erkrankung Gonorrhö

(Booy and Kroll, 1998; Nassif, 1999; Merz and So, 2000; Morand *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2015).

K. kingae gehört ebenfalls zu der Familie der *Neisseriaceae* und gilt als häufiger Auslöser von septischer Arthritis, Osteomyelitis und Bakteriämie bei Kindern von bis zu 3 Jahren. Hierbei adhäriert *K. kingae* mittels Typ IV Pili zunächst asymptomatisch an den Epithelien des Oropharynx und kolonisiert dann nach der Passage der epithelialen Barriere den Blutstrom, die Gelenke und Knochen sowie das Endokard (Davis and Peel, 1982; Yagupsky and Dagan, 1994; Chometon *et al.*, 2007; Kehl-Fie *et al.*, 2008; Basmaci *et al.*, 2012; Yagupsky, 2015).

Das durch Insekten übertragende phytopathogene *X. fastidiosa* ist unter anderem der Verursacher der Pierce's Krankheit bei Weinreben. Dabei vermehrt sich das Bakterium exklusiv innerhalb des Xylems und induziert somit das Absterben der Blätter. Auch hier tragen die Typ IV Pili maßgeblich zur Migration innerhalb des Xylems sowie zur Biofilmbildung von *X. fastidiosa* bei (Hopkins, 1989; Almeida and Purcell, 2003; Meng *et al.*, 2005; De La Fuente *et al.*, 2007).

V. paradoxus ist hingegen ein ubiquitär vorkommendes Bodenbakterium, welches vorwiegend mit der Rhizosphäre interagiert. Es kann in selteneren Fällen jedoch auch die menschliche Mundhöhle besiedeln oder als Teil des vaginalen Mikrobioms vorliegen (Anesti *et al.*, 2005; Maimaiti *et al.*, 2007; Schellenberg *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2011; Pehl *et al.*, 2012).

In der strukturellen Analyse des *L. pneumophila* PilY1 Proteins konnten basierend auf Sequenzhomologien zwei funktionelle Proteindomänen charakterisiert werden. So weist der N-terminale Bereich eine von Willebrand Faktor A (vWFA) Domäne auf und am C-Terminus konnte eine *Neisseria*_PilC Domäne bzw. PilY-Domäne identifiziert werden.

Von Willebrand Faktor A Domänen liegen hauptsächlich bei extrazellulären eukaryotischen Proteinen vor, welche mit der extrazellulären Matrix assoziiert oder an der Zell-Adhäsion beteiligt sind. Häufig spielen Domänen mit divalenten Kationen, sogenannte MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) Motive, eine Rolle in dieser Proteininteraktion. Die Funktion der vWFA Domänen in prokaryotischen Proteinen ist jedoch weitgehend uncharakterisiert (Whittaker and Hynes, 2002). In *L. pneumophila* konnte bereits eine vWFA Domäne in dem Oberflächenprotein RtxA identifiziert werden. RtxA ist unter anderem an der Adhärenz und Phagozytose von *L. pneumophila* beteiligt (Cirillo *et al.*, 2001; D'Auria *et al.*, 2008). Generell weisen Proteine der RTX (repeats-in toxin) Familie häufiger vWFA Domänen auf und sind überwiegend an Adhäsionsprozessen beteiligt (Ruggeri and Ware, 1993; Colombatti *et al.*, 1993). So verfügt das Adhäsins BrtA von *Bordetella bronchiseptica* sowohl über ein RTX Motiv, als auch über eine vWFA Domäne, welche in Adhärenz sowie

Biofilmbildung involviert ist. *B. bronchiseptica* besiedelt den oberen respiratorischen Trakt und kann unter anderem Keuchhusten auslösen (Nishikawa *et al.*, 2016). Desweiteren sind vWFA Domänen vertreten bei mit der extrazellulären Matrix interagierenden Proteinen. Dazu zählt das Integrin-Bindeprotein BB0172 des Lyme-Borreliose Erregers *Borrelia burgdorferi* sowie die Serinprotease Tp0750 des Syphilis Erregers *Treponema pallidum* (Wood *et al.*, 2013; Houston *et al.*, 2014).

Im Zusammenhang mit Typ IV Pili wurden vWFA Domänen in den Proteinen PilA von *Streptococcus agalactiae* und auch im TadG von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identifiziert. *S. agalactiae* kolonisiert den humanen gastro-intestinal Trakt sowie den urogenital Trakt. *A. actinomycetemcomitans* kann hingegen die Mundhöhle besiedeln. In beiden Fällen sind die beschriebenen Proteine involviert in die Typ IV Pilus-abhängige Adhäsion an Epithelzellen (Kachlany *et al.*, 2000; Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2013).

Eine vWFA Domäne konnte ebenfalls bei dem PilY1 von *P. aeruginosa* und bei dem PilC1 von *K. kingae* identifiziert werden (Kuchma *et al.*, 2010). So wurde eine mögliche Funktion der vWFA Domäne für PilY1-ähnliche Proteine bereits für *P. aeruginosa* beschrieben. Hier wird eine zusätzliche Funktion der Typ IV Pili als potentielle Mechanosensoren diskutiert. Insbesondere die vWFA Domäne aus PilY1 soll durch mechanische Beanspruchung bzw. entstehende Scherkräfte die Assoziation an eine biotische oder abiotische Oberfläche detektieren. Nach diesem Modell induziert PilY1 über das Zweikomponentensystem Chp zusammen mit dem Quorum Sensing System LasR die Expression von Virulenzfaktoren in Abhängigkeit zur Oberflächenadhäsion (Siryaporn *et al.*, 2014; Persat *et al.*, 2015; Inclan *et al.*, 2016).

Grundlegend sind hierfür die mechanosensorischen Eigenschaften der eukaryotischen vWFA Domäne. Diese bewirken hervorgerufen durch den Scherstress des Blutstroms eine Konformationsänderung des von Willebrandfaktors und bedingen somit die Assoziation von Thrombozyten und den Verschluss des Endothels (Springer, 2014). Jedoch sind ähnliche mechanosensorische Regulationen auch in Prokaryoten beschrieben. So beeinflusst Scherstress zum Teil die Adhäsion von *E. coli* und *P. aeruginosa* an Zielzellen. Desweiteren verfügt die Flagelle wahrscheinlich ebenfalls über mechanosensorische Eigenschaften (Thomas *et al.*, 2002; Lecuyer *et al.*, 2011; Lele *et al.*, 2013; Ellison and Brun, 2015).

Zusammenfassend spielt die vWFA Domäne bei einer Vielzahl von Bakterien eine Rolle in der Detektion und Assoziation an Oberflächen. Dies stimmt weitgehend mit der Funktion in Eukaryoten überein. Generell sind auch die N-terminalen Regionen des Proteins PilY1 von *P. aeruginosa* und insbesondere das PilC1 *N. meningitidis* unabhängig von der vWFA Domäne an der Wirtszelladhäsion beteiligt. In Anbetracht der unterschiedlichen

Wirtsspektren könnte dies eine Ursache für die geringe Sequenzhomologie dieser Bereiche sein (Morand *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2011).

Im Gegensatz dazu liegen die größten Homologien im C-terminalen Bereich des PilY1 Proteins vor. Die hier identifizierte *Neisseria*_PilC Domäne ist ebenfalls in den Proteinen von *P. aeruginosa*, *K. kingae*, *X. fastidiosa* und *V. paradoxus* zu finden, wobei die Homologie zu der PilY-Domäne von *P. aeruginosa* besteht. Die PilY-Domäne weist, wie bei pathogenen *Neisseria* spp. vermutet, eine typische aus acht Schlaufen bestehende β -Propeller Struktur auf. Darüber hinaus verfügt die PilY-Domäne über einen EF-hand like Ca^{2+} -Bindungs-Loop, welcher ebenfalls bei *N. gonorrhoeae* und *K. kingae* identifiziert werden konnte (Orans *et al.*, 2010; Porsch *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013). Diese *Neisseria* PilC β -Propeller Domäne oder PilY-Domäne ist in beiden Spezies sowohl an der Typ IV Pilus-Biogenese, als auch an seiner Funktion beteiligt. Somit kann der PilY-Domäne hauptsächlich eine Funktion in der Typ IV Pilus-Regulation zugeordnet werden.

In zellulären Fraktionierungsexperimenten konnte das *L. pneumophila* PilY1 in der äußeren Membran lokalisiert werden. Jedoch konnte PilY1 weder in den äußeren Membran Vesikeln, noch in den untersuchten Kulturüberständen nachgewiesen werden (Galka *et al.*, 2008). Dies deutet zum einen auf eine mögliche Verankerung in der äußeren Membran hin, welche durch die postulierte Transmembran Domäne am N-Terminus erfolgen könnte. Zum anderen könnte PilY1 aufgrund einer geringen Abundanz des Proteins innerhalb der äußeren Membran nicht mit in die OMVs integriert werden.

Konsistent mit diesen Ergebnissen sind die PilC Proteine der pathogenen *Neisseria* spp. ebenfalls in der äußeren Membran lokalisiert und assoziieren darüber hinaus auch an das Typ IV Pilusfilament. Hier fungiert das PilC Protein als Adhäsion an der Pilusspitze und bindet während der *Neisseria* Infektion an Epithelzellen (Rudel *et al.*, 1995; Rahman *et al.*, 1997). Das *P. aeruginosa* PilY1 kann auch in der äußeren Membran und dem Typ IV Pilus nachgewiesen werden. Zusätzlich lokalisiert PilY1 in der inneren Membran von *P. aeruginosa* und ist zusätzlich im Kulturüberstand sowie extrazellulären Aggregaten nachweisbar (Alm *et al.*, 1996; Bohn *et al.*, 2009; Kuchma *et al.*, 2010; Heiniger *et al.*, 2010). Vor diesem Hintergrund wird davon ausgegangen, dass im Hinblick auf die zahlreichen PilY1-assoziierten Phänotypen die subzelluläre Lokalisation des Proteins eine regulatorische Funktion hat (Bohn *et al.*, 2009; Kuchma *et al.*, 2010; Kuchma *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2015). So ist die PilY1 Oberflächenlokalisierung an der äußeren Membran abhängig vom Typ IV Pili Biogenese Apparat sowie von den Pilin-ähnlichen Proteinen FimU, PilVWX und PilE, welche als Teil des PilY1 Operons kodiert sind. In einem daraus resultierenden Modell wird postuliert, dass die Pilin-ähnliche Proteine PilVWXE mit PilY1 einen Subkomplex bilden, um die Polymerisation des Pilus zu initiieren. FimU koppelt

anschließend den Subkomplex an die Pilin-Untereinheit PilA durch eine direkte Interaktion mit PilE, PilV und PilA. Auf diese Weise könnte PilY1 sowohl in die Pilusspitze als auch in das Pilusfilament integriert werden. Bei der Depolymerisierung des Pilus könnte der Initiationskomplex nicht mehr in die Zelle aufgenommen werden und PilY1 somit in der Membran verbleiben (Giltner *et al.*, 2010; Heiniger *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015). Darüber hinaus ist ein orthologes Cluster von Pilin-ähnlichen Proteinen notwendig für die Lokalisation von PilC in den Typ IV Pilus von *N. gonorrhoeae*. Jedoch können PilC Proteine auch in der äußeren Membran von *Neisseria* nachgewiesen werden (Rahman *et al.*, 1997; Winther-Larsen *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2015).

Zusammenfassend sind PilY1 und PilC von *P. aeruginosa* und pathogenen *Neisseria* spp. multifunktionelle Proteine, welche anhängig von ihrer Lokalisation in den Pilusfilamenten oder der äußeren Membran unterschiedliche Funktionen wie Wirtszelladhäsion oder Motilität beeinflussen (Rudel *et al.*, 1995; Morand *et al.*, 2004; Heiniger *et al.*, 2010). Diese multifunktionalen Phänotypen konnten auch für das *L. pneumophila* PilY1 beobachtet werden. So konnte bei *L. pneumophila*, ähnlich wie bei *P. aeruginosa*, die Expression von PilY1 an der Zelloberfläche nur in Abhängigkeit vom Oberflächen assoziiertem Wachstum beobachtet werden (Luo *et al.*, 2015). Hinzu kommt, dass auch *L. pneumophila* über ein homologes Pilin-Gencluster verfügt und *pilY1* in eine Operonstruktur von anderen Pilin-ähnlichen Genen eingebettet ist. Eine vorläufige Interaktionsanalyse des *L. pneumophila* PilY1 lässt ebenfalls auf vergleichbare Funktionen der Pilin-ähnlichen Proteine schließen (siehe Abbildung 7.1).

Die Regulation der PilY1 Expression scheint bei *L. pneumophila* jedoch analog zur Flagellenbiosynthese im Zuge des Eintritts in die transmissive oder stationäre Wachstumsphase zu erfolgen (Heuner *et al.*, 2002). Generell zeichnet sich die transmissive Phase durch die Expression von Dot/Icm Effektoren sowie anderen Virulenzfaktoren aus, um die Infektion bzw. Neuinfektion von Wirtszellen zu ermöglichen (Brüggemann *et al.*, 2006). Korrespondierend zu diesen Ergebnissen konnte in Transkriptomanalysen eine PilY1 Expression nur in der transmissiven oder post-exponentiellen Wachstumsphase nachgewiesen werden, wobei eine maximale Expression nur in der *in vivo* Infektion von Makrophagen oder Amöben erfolgte (Brüggemann *et al.*, 2006; Faucher *et al.*, 2011). Dennoch könnte nicht nur die Regulation der Expression sondern auch die Lokalisation von PilY1 in der Anpassung an die unterschiedlichen extra- und intrazellulären Lebensbedingungen von *L. pneumophila* von Vorteil sein.

Zusammenfassend konnte PilY1 als ein Virulenzfaktor charakterisiert werden, welcher große Homologien zu anderen pathogenen Spezies aufweist. Diese homologen Proteine wurden bereits weitgehend als oberflächenrelevante Virulenzfaktoren ausgewiesen.

Ergänzend konnte *pilY1* exklusiv in pathogenen *L. pneumophila* Spezies identifiziert werden und nicht in avirulenten nicht-pneumophila Stämmen (Hoppe, Julia. 2011). Dies untermauert zusätzlich die Bedeutung von PilY1 in der *L. pneumophila* Pathogenese.

7.2. PilY1 beeinflusst die Pathogenese von *L. pneumophila* in der Infektion von humanem Lungengewebe

Die *ex vivo* Infektion von humanem explantiertem Lungengewebe kombiniert als Modellsystem sowohl die Vorteile einer Studie an humanen Zellen, als auch die der Interaktion mit den verschiedenen Zelltypen innerhalb eines komplexen Gewebes. Eine Untersuchung der *L. pneumophila* Pathogenese wird sowohl im Hinblick auf die Interaktionen mit den entsprechenden Wirtzellen, als auch mit den Komponenten des Gewebes, insbesondere der extrazellulären Matrix, durch die HLTE Infektion ermöglicht. Dies spiegelt im großen Umfang die *in vivo* Bedingungen einer pulmonalen *Legionella*-Infektion wieder, ohne die Limitationen von Zellkultursystemen oder Tiermodellen (Jäger *et al.*, 2014).

Darüber hinaus konnten in histologischen Analysen infizierter HLTEs zahlreiche Gewebsveränderungen bzw. Schäden beobachtet werden. Hierzu zählen unter anderem die Bildung von Protein-Exudat, eine Delaminierung der Epithelzellen sowie eine Desintegration der alveolaren Septen. Diese histologischen Gewebeschäden stehen in Korrespondenz zu Autopsieresultaten von Legionellose-Patienten und geben somit Auskunft über die Validität der HLTE-Infektionen (Glavin *et al.*, 1979; Weisenburger *et al.*, 1981; Winn and Myerowitz, 1981; Jäger *et al.*, 2014). Für die Pathogene *Chlamydomphila pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* wurde die Infektion von humanem explantiertem Lungengewebe ebenfalls als Modellsystem etabliert (Rupp *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Drömann *et al.*, 2010).

Die Analyse der Replikation der $\Delta pilY1$ Deletionsmutante innerhalb des Lungengewebes konnte ebenfalls erste Hinweise auf den Einfluss von PilY1 für die Pathogenität von *L. pneumophila* in einer humanen Infektion liefern. So zeigte die $\Delta pilY1$ Deletionsmutante im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp eine signifikante Attenuation der Replikation nach 48 Stunden der HLTE-Infektion. Dieser Vermehrungsdefekt konnte durch die Expression von *pilY1* zu großen Teilen komplementiert werden. Das Fehlen einer vollständigen Komplementation ist wahrscheinlich auf das Antibiotika und IPTG abhängige Expressionssystem der *pilY1* Komplementante zurückzuführen. Vermutlich sind diese Moleküle im Verlauf der Infektion innerhalb des Gewebes nicht ausreichend zugänglich. Dennoch konnte ein Beitrag von PilY1 zur Vermehrungsfähigkeit von *L. pneumophila* während der Infektion vom humanen Lungengewebe nachgewiesen werden. Die Funktion von PilY1 innerhalb des komplexen Gewebes bzw. der Pathogenität von *L. pneumophila*

bedarf jedoch weiterer Aufklärung. So gehört neben der intrazellulären Replikation auch die Dissemination und Persistenz innerhalb des infizierten Gewebes zu den zentralen Aspekten einer pulmonalen *L. pneumophila* Infektion. Obgleich dies keine direkte Anpassung an die Besiedlung des menschlichen respiratorischen Trakts darstellt, sondern eher eine erworbene Anpassung an natürliche Biofilme entspricht (Newton *et al.*, 2010; Hilbi *et al.*, 2011).

So kann in der frühen Phase der Infektion in erste Linie eine Assoziation der Bakterien an die alveolaren Oberflächen beobachtet werden. Dies lässt drauf schließen, dass diese extrazellulären Oberflächen für *L. pneumophila* zunächst als initiale Bindestelle innerhalb des Lungengewebes dienen und somit die Persistenz und Dissemination im Gewebe gewährleisten. Im Folgenden kann es dann zur Invasion in alveolare Makrophagen kommen, in welchen große bakterielle Cluster in den späteren Phasen zu beobachten sind (Jäger *et al.*, 2014). Studien mit *P. aeruginosa* an humanen respiratorischen Epithelzellen zeigten, dass PilY1 in Assoziation mit Typ IV Pili sowohl an der Adhärenz als auch an der Penetration und Dissemination in das mukosale Epithelium beteiligt ist (Heiniger *et al.*, 2010). Analog konnte eine PilC und Typ IV Pilus-abhängige Bindung an respiratorische Epithelzellen bei *K. kingae* und pathogener *Neisseria* spp. beobachtet werden (Scheuerpflug *et al.*, 1999; Kirchner *et al.*, 2005; Kehl-Fie *et al.*, 2008). Für *L. pneumophila* ist eine Interaktion sowohl mit respiratorischen Epithelzellen, als auch der extrazellulären Matrix unter anderem für das Lcl Protein (*Legionella* collagen-like protein) und das Mip Protein (macrophage infectivity potentiator) beschrieben. Das Lcl Protein fungiert als Adhäsion in der Interaktion mit Lungenepithelzellen. Ferner ist es an der Biofilmbildung und Autoaggregation von *L. pneumophila* beteiligt, welche ebenfalls bei der Kolonisierung des Lungengewebes von Bedeutung sein können (Vandersmissen *et al.*, 2010; Duncan *et al.*, 2011; Mallegol *et al.*, 2012; Abdel-Nour *et al.*, 2014). Eine Bindung an die extrazelluläre Matrix des Lungenepithels insbesondere an die Collagentypen I-VI erfolgt durch das Mip Protein (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001; Ünal *et al.*, 2011). Jedoch ist auch eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix und Lungenepithelzellen durch die vWFA Domäne des PilY1 Protein denkbar. Ähnliche Eigenschaften wurden hier bereits für die Spezies *B. bronchiseptica*, *B. burgdorferi*, *T. pallidum*, *A. actinomycetemcomitans* und *S. agalactiae* diskutiert.

Der zentrale Aspekt für die pulmonale *L. pneumophila* Infektion liegt jedoch in der intrazellulären Replikation und der Vermehrung im Lungengewebe. Hier gehören die alveolaren Makrophagen und Epithelzellen zu den vorrangigen Wirtszellen für *L. pneumophila*. Da sich *L. pneumophila* in HLTEs hauptsächlich in Makrophagen vermehrt, sind die beobachteten Replikationsnachteile vermutlich auf die gleichen

Mechanismen wie in der Makrophageninfektion zurückzuführen (Mody *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 1998; Jäger *et al.*, 2014).

Abschließend wird deutlich, dass PilY1 innerhalb des komplexen Lungengewebes vielfältige Interaktionen in der intrazellulären Replikation sowie in der Dissemination beeinflussen kann. Dies beinhaltet im Speziellen sowohl das intrazelluläre Trafficking und die Sekretion von Effektoren als auch Adhäsionseffekte oder bakterielle Motilität. Diese spezifischen Pathogenitätsmechanismen sollen im Weiteren diskutiert werden.

7.3. PilY1 ist an der Oberflächentranslokation und Transmission von *L. pneumophila* beteiligt

Die bakterielle Motilität ist eine wesentliche Komponente im Bezug auf die Fitness in den diversen Habitaten eines ubiquitär verbreiteten Bakteriums wie *L. pneumophila*. Die spezialisierte Translokation über halb feste Oberflächen wie zum Beispiel mukosale Epithelien ist von zentraler Bedeutung für eine erfolgreiche Kolonisierung als opportunistisches Pathogen. Dies ermöglicht unter anderem die Dissemination bzw. Migration innerhalb des infizierten Gewebes sowie die Adhäsion an Zielzellen und trägt damit auch zur Biofilmbildung bei. Somit kann die Motilität indirekt auch andere Virulenz-assoziierte Eigenschaften beeinflussen (Alarcon *et al.*, 2009; Kearns, 2010; Taylor and Buckling, 2011; Burrows, 2012).

Die Typ IV Pilus-vermittelte Motilität, genannt Twitching Motility, ist in *P. aeruginosa*, *K. kingae* und pathogenen *Neisseria* spp. unter anderem durch die Proteine PilY1 und PilC1 beeinflusst (Morand *et al.*, 2004; Bohn *et al.*, 2009; Porsch *et al.*, 2013). Hier führt, konsistent zu den Beobachtungen von *L. pneumophila*, der Verlust von PilY1 oder dem entsprechenden Homolog zu einer signifikant eingeschränkten Twitching Motility Aktivität. In *P. aeruginosa* und pathogenen *Neisseria* spp. ist diese verringerte Motilität auf das Fehlen der Typ IV Pilusfilamente zurückzuführen, da PilY1 bzw. PilC an der Pilus-Homöostase, bestehend aus der Pilus-Polymerisierung sowie Depolymerisierung, beteiligt ist. So stabilisieren die PilY1-homologen Proteine den Typ IV Pilus antagonistisch zur PilT abhängigen De-polymerisierung (Morand *et al.*, 2004; Orans *et al.*, 2010; Heiniger *et al.*, 2010). Bei dem PilT Protein handelt es sich um eine hexamere ATPase. Diese ist an der cytoplasmatischen Membran lokalisiert und gehört zum Motorkomplex. PilT energetisiert so die Depolymerisierung und daraus resultierend die Retraktion des Typ IV Pilus. Der Verlust von PilT führt zu einer Hyperpilierung der Mutanten und so zu einer verringerten Twitching Motility Aktivität (Whitchurch *et al.*, 1991; Alm and Mattick, 1996; Winther-Larsen *et al.*, 2005; Chiang *et al.*, 2008; Misic *et al.*, 2010). Das *L. pneumophila* Gen LPC_1497 ist ebenfalls als Twitching Motility Protein PilT sowie Pilus-Retraktion ATPase annotiert. Anhand von NCBI Protein BLAST konnte eine 75 % Übereinstimmung zu der PilT-ATPase

von *P. aeruginosa* sowie eine 65 % Übereinstimmung zu *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* identifiziert werden (siehe Abbildung 7.2). Diese Proteine gehören zu der Familie der P-Loop NTPasen und verfügen über ein Walker A und B Motiv bzw. eine ATP-Bindestelle. Eine ähnliche Proteininteraktion wäre demnach auch für Typ IV Pilus-Biogenese und Regulation der Twitching Motility Aktivität von *L. pneumophila* möglich.

<i>L. pneu</i>	1	MDIAELLAFSVKKNSSDLHISAGMPPMIRVDGDLRKINLPPLEHKDVIKIITYDIMNDRQR
<i>P. aeru</i>	1	MDITELLAFSAKQAGASDLHLSAGLPPMIRVDGDVRRINLPPLEHKQVHALIYDIMNDKQR
<i>N. gon</i>	1	MQITDLLAFGAKNKASDLHLSSGISPMIRVHGDMMRRINLPMSAEVGNMVTSMVNDHQ
<i>N. men</i>	1	MQITDLLAFGAKNKASDLHLSSGISPMIRVHGDMMRRINLPMSAEVGNMVTSMVNDHQ
cons.	1	* * * * * * * * *
<i>L. pneu</i>	61	KEYEEFLETDFSFEIANLARFRVNAFNQSRGAAAVFRTIPCEILSMEDLGLPPIFKEMAS
<i>P. aeru</i>	61	KDEEEFLETDFSFEVPGVARFRVNAFNQNRGAGAVFRTIPSKVLTMEELGMGEVFKRVSD
<i>N. gon</i>	61	KIYQQNLEVDFFSFLPNVARFRVNAFNITGRGPAAVFRTIPSTVLSLEELKAPSIFQKIAE
<i>N. men</i>	61	KIYQQNLEVDFFSFLPNVARFRVNAFNITGRGPAAVFRTIPSTVLSLEELKAPSIFQKIAE
cons	61	* * * * * * * *
<i>L. pneu</i>	121	FSRGLVLVTGPTGSGKSTTLAAVIDYINSTRYEHILTVEDPIEFVHQSKKCMVNQREVHK
<i>P. aeru</i>	121	VPRGLVLVTGPTGSGKSTTLAAMDYINNTKYHHILTIEDPIEFVHESKKCLVNQREVHR
<i>N. gon</i>	121	SPRGMVLVTGPTGSGKSTTLAAMINYINETQPAHILTIEDPIEFVHQSKKSLINQRELHQ
<i>N. men</i>	121	SPRGMVLVTGPTGSGKSTTLAAMINYINETQPAHILTIEDPIEFVHQSKKSLINQRELHQ
cons	121	. . * * * * * * *
<i>L. penu</i>	181	DTLSFNAAALRSALREDPDIIILVGEIRDLETIRLMTAAETGHLVFGTLHTNSATKTIINRI
<i>P. aeru</i>	181	DTLGFSEALRSALREDPDIIILVGEMRDLETIRLALTAETGHLVFGTLHTTTSAAKTIDRV
<i>N. gon</i>	181	HTLSFNAAALRSALREDPDVILVGEMRDPETIGLALTAETGHLVFGTLHTTTGAAKTVDR
<i>N. men</i>	181	HTLSFNAAALRSALREDPDVILVGEMRDPETIGLALTAETGHLVFGTLHTTTGAAKTVDR
cons	181	* * * * * * *
<i>L. penu</i>	241	IDVFPAEEKSMVRSMLSESLSQAVVAQSLLKKNK-GGRVAALEIMMCTGAIRNLIREDKIA
<i>P. aeru</i>	241	VDVFPAEEKAMVRSMLSESLSQVISQTLIKKIG-GGRVAAHEIMIGTPAIRNLIREDKVA
<i>N. gon</i>	241	VDVFPAEEKEMVRSMLSESLSQVISQNLKTHDGNGRVASHEILIANPAVRNLIRENKIT
<i>N. men</i>	241	VDVFPAEEKEMVRSMLSESLSQVISQNLKTHDGNGRVASHEILIANPAVRNLIRENKIT
cons	241 * * * * * *
<i>L. pneu</i>	300	QMYSSIQTGQAKGMQTLDOHLTELVNKNIIISKHTAHEAALNKSL--F
<i>P. aeru</i>	300	QMYSAIQTGGSLGMQTLDMCLKGLVAKGLISRENAREKAKIPEN--F
<i>N. gon</i>	301	QINSVLQTGQASGMQTMDSLSQSLVRQGLIAPEAARRRAQNSESMSF
<i>N. men</i>	301	QINSVLQTGQASGMQTMDSLSQSLVRQGLIAPEAARRRAQNSESMSF
cons	301	* * * * * *

Abbildung 7.2: Alignment der homologen PilT-ATPasen. Die Aminosäure-Sequenzen der PilT-ATPasen von *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* und *N. meningitidis* wurden mit dem Programm Clustal Omega (multiple sequence alignment Programm) von EMBL-EBI align und ausgewertet (Sievers *et al.*, 2011). Die Homologie der Aminosäuren wurde graduell von schwarz bis weiß gekennzeichnet. Konservierte Aminosäuren sind in schwarz bzw. mit einem "*" markiert. Eine geringere Konservierung ist in grau dargestellt und durch einen "." gekennzeichnet. Nicht Übereinstimmende Aminosäuren sind weiß.

Zusätzlich wird die Typ IV Pilus-Biogenese und Stabilität in *P. aeruginosa*, *K. kingae*, *X. fastidiosa* und pathogenen *Neisseria* spp. durch eine konservierte C-terminale Ca^{2+} -Bindungsdomäne in den PilY1-homologen Proteinen reguliert. So führen Mutationen dieser Domäne bzw. der Verlust der Ca^{2+} -Bindungseigenschaften zu einer reduzierten Twitching Motility Aktivität (Orans *et al.*, 2010; Porsch *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2014). Für *P. aeruginosa* wird ein Model postuliert in dem PilY1 durch die Bindung von

Calcium die PilT-ATPase inhibiert und hingegen PilY1 in seiner Calcium-freien Form die Depolymerisierung des Pilus durch PilT ermöglicht. Eine Mutation des Ca^{2+} -Bindungsmotivs kann somit das Gleichgewicht zwischen Pilus-Polymerisierung und Depolymerisierung stark in Richtung der Pilus-Degradation verschieben (Orans *et al.*, 2010). So konnte auch eine Ca^{2+} -abhängige Expression der PilT-ATPase in *X. fastidiosa* beobachtet werden (Cruz *et al.*, 2014). Hingegen konnte bei *K. kingae* und *N. gonorrhoeae* kein direkter Einfluss auf die Typ IV Pilus-Biogenese nachgewiesen werden (Porsch *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013). Da bei *L. pneumophila* gezeigt werden konnte, dass die Twitching Motility Aktivität in Abhängigkeit von der C-terminalen PilY1 Domäne ist, ist eine Korrelation mit einer Ca^{2+} -Interaktion sehr interessant. Zumal ein strukturell vergleichbarer Ca^{2+} -Bindungsloop zu *P. aeruginosa* gezeigt werden konnte, welcher jedoch nicht das konservierte Dx[DN]xDGxxD Motiv aufweist. Jedoch war eine Ca^{2+} -Bindung der *L. pneumophila* C-terminalen PilY1 Domäne methodisch nicht nachweisbar. Dennoch weisen diese prokaryotischen Proteine bzw. Motive eine sehr große Diversität hinsichtlich der Struktur und Sequenz auf. Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine konvergente Evolution in Anpassung an die Motilität in entsprechenden Nischen mit höheren Calciumkonzentrationen (Rigden *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2015; Domínguez *et al.*, 2015). Dem *L. pneumophila* PilY1 Protein und der PilY1-Domäne im Speziellen könnte somit in erster Linie eine Funktion in der Typ IV Pilus-Regulation zugeordnet werden. Die Regulation der Homöostase zwischen Pilus-Polymerisation und Depolymerisation begünstigt folglich die Twitching Motility Aktivität. Ein möglicher regulatorischer Einfluss durch ein Ca_2^+ -Bindungsmotiv innerhalb der C-terminalen PilY-Domäne ist dabei weiterhin nicht gänzlich auszuschließen und bedarf zusätzlicher Analysen.

Zusätzlich beeinflusst das PilY1 Protein die Swarming Motility Aktivität von *P. aeruginosa* und *V. paradoxus*. Hierbei handelt es sich um eine Flagellen-abhängige Bewegungsform, durch einen von den Zellen produzierten Tensidfilm (Kuchma *et al.*, 2010; Pehl *et al.*, 2012). Swarming Motility ist für *L. pneumophila* nicht bekannt, jedoch ist eine Flagellen- und Typ IV Pilus-unabhängige Oberflächen Translokation beschrieben. Die Sliding Motility Aktivität von *L. pneumophila* wird ebenfalls durch einen sezernierten Tensidfilm generiert und die Bewegung erfolgt durch die passive Ausbreitung der wachsenden Kolonie entlang des Tensidfilms. (Stewart *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2011). In den Sliding Motility Experimenten konnte ein konträrer Oberflächen Phänotyp im Vergleich zur Twitching Motility beobachtet werden. Die *L. pneumophila pilY1* Mutante zeigt hier eine verstärkte Oberflächentranslokation und erhöhte Tensidbildung im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby Wildtyp.

Studien in *P. aeruginosa* konnten zeigen, dass PilY1 als ein Repressor für die Swarming Motility fungiert, somit konnten hier vergleichbare Ergebnisse zu *L. pneumophila* erzielt werden (Kuchma *et al.*, 2007; Kuchma *et al.*, 2010). In diesem Prozess aktiviert das an der Oberfläche lokalisierte *Pseudomonas* PilY1 durch den Typ IV Pilus Alignment Subkomplex PilMNOP die Di-Guanylatcyclase SadC und initiiert somit die zyklische di-GMP (c-di-GMP) Produktion. Die resultierenden erhöhten c-di-GMP Level führen dann zu einer Repression der Swarming Motility (Kuchma *et al.*, 2010; Kuchma *et al.*, 2012).

Darüber hinaus reguliert PilY1 auch die Pilin-ähnlichen Proteine des Initiationskomplexes PilVWX in einer zyklischen AMP (cAMP) vermittelten Feedbackschleife sowie die eigene Expression und subzelluläre Lokalisation. Für diesen Oberflächen bedingten Phänotyp ist insbesondere die vWFa Domäne von Bedeutung (Siryaporn *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015; Persat *et al.*, 2015). Interessanterweise konnte dieser Effekt auch in den Sliding Motility Experimenten mit *L. pneumophila* beobachten werden. So konnte zwar mit dem WT PilY1 Protein eine vollständige Komplementation erzielt werden, jedoch führte der Verlust der vWFa Domäne zu einer erhöhten Sliding Motility Aktivität und Tensindbildung ähnlich der *pilY1* Mutante. Dies lässt spekulieren, dass die vWFa Domäne des *L. pneumophila* PilY1 Proteins ähnliche regulatorische Funktionen ausüben könnte.

Hinzukommend wurde für *P. aeruginosa* gezeigt, dass PilY eine zentrale Rolle in der Koordination der Motilitätsformen Swimming, Swarming und Twitching Motility spielt. So stellt PilY1 in seiner Interaktion mit dem Alignment Subkomplex PilMNOP und den Pilin-ähnlichen Proteinen PilGHIJK ein Bindeglied in der Signaltransduktion des Chemosensory-System Chp dar. So Reguliert PilY1, wie bereits erläutert, die Swarming Motility mittels der Di-Guanylatcyclase SadC und der resultierenden c-di-GMP Konzentration. Zusätzlich wird mittels der Pilin-ähnlichen Proteine PilGHIJK, wobei PilIJ in die innere Membran verankert ist, die cAMP Konzentration reguliert. Hierbei wird über den Pilin-Komplex das Chp Chemosensory-System aktiviert, welcher die CyaB abhängige cAMP Produktion induziert. Das aktivierte Chp Systems und die erhöhten cAMP Konzentrationen bewirken eine Vfr bedingte Transkription von Virulenzgenen und eine erhöhte Aktivität der Typ IV Pilus ATPasen PilT und PilB. (Whitchurch *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2015; Persat *et al.*, 2015; Inclan *et al.*, 2016). Als möglicher Sensor für diese regulatorischen Mechanismen könnte die vWFa Domäne gelten, welche chemotaktisch durch Konformationsänderungen über den gesamten Typ IV Pilus die Chp Signalkaskade auslöst und somit Twitching Motility begünstigt. (Siryaporn *et al.*, 2014; Persat *et al.*, 2015; Inclan *et al.*, 2016).

Ähnliche Signaltransduktions- bzw. Zwei-Komponenten-Systeme sind in *L. pneumophila* noch nicht beschrieben. Dennoch deuten die hier beobachtenden und konträren Oberflächen Phänotypen daraufhin, dass PilY1 einen multifaktoriellen Einfluss auf die Oberflächen Translokation in *L. pneumophila* einnehmen muss. Somit wären vergleichbare

regulatorische Mechanismen hinsichtlich der funktionellen Lokalisation und Protein-Protein Interaktion von PilY1 denkbar. Dies würde zum einen die Anpassung der Motilitätseigenschaften an entsprechende Oberflächen ermöglichen, als auch den Übergang aus der motilen Form in die gezielte Adhäsion an eine Oberfläche bzw. eine potenzielle Wirtszelle. Die Regulation der Oberflächentranslokation könnte somit nicht nur die Migration der Bakterien sondern auch die Transmission zwischen den Wirtszellen hinsichtlich einer Infektion in humanem Lungengewebe beeinflussen.

7.4. PilY1 trägt als Adhäsionsfaktor zur Initiation der Infektion von *L. pneumophila* bei

Die effiziente Adhäsion und Internalisierung in eine Wirtszelle spielen eine entscheidende Rolle in der *L. pneumophila* Pathogenese. Dabei wird die Adhäsion und Invasion als kritischer Mechanismus für die erfolgreiche Etablierung der intrazellulären Infektion und damit einhergehend für das Überleben in der Umwelt oder der Kolonisierung der menschlichen Lunge betrachtet. Solche Interaktionen können unter anderem durch Typ IV Pili oder durch Pilus-assoziierte Adhäsine erfolgen (Hahn, 1997; Scheuerpflug *et al.*, 1999; Cirillo *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2005; Giltner *et al.*, 2006). Überdies sind neben den Pilus-abhängigen auch Pilus-unabhängige Adhäsine bekannt. Hierzu zählen bei *L. pneumophila* unter anderem die Oberflächen Proteine MOMP, Lcl, LaiA und RtxA (Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990; Cirillo *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2011).

Herauszustellen ist jedoch, dass im Gegensatz zu den genannten *L. pneumophila* Adhäsinen, für PilY1 ein signifikanter Einfluss auf die Adhäsion und Invasion in sowohl umweltassoziierten als auch humanen Wirtssystemen beobachtet werden konnte. So zeigte die *L. pneumophila pilY1* Mutante sowohl eine stark reduzierte Adhäsionsrate zu der Amöbe *D. discoideum* als auch in humanen Makrophagen und Lungenepithelzellen. In den humanen Wirtszellmodellen konnte zusätzlich auch eine PilY1-abhängige Reduktion der Invasionsrate nachgewiesen werden. Diese Resultate demonstrieren, dass PilY1 in die Adhäsion an die zentralen Wirtszellen der humanen *L. pneumophila* Infektion involviert ist, was wahrscheinlich in einer anschließenden Attenuation der Invasion resultiert. Dies ist wiederum in Übereinstimmung mit der Annahme, dass der Adhäsionsprozess bzw. die Bindung an die Wirtszelle zur Initiation der Phagozytose führt. Außerdem wird spekuliert, dass die Internalisierung in die Wirtszelle durch Dot/Icm Effektoren stimuliert werden könnte (Hilbi *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005). Für *L. pneumophila* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Bakterien während der frühen Phase der humanen Lungeninfektion größtenteils an die alveolaren Oberflächen bzw. die alveolaren Epithelzellen adhären (Jäger *et al.*, 2014). In *P. aeruginosa* ist ebenfalls die Abhängigkeit von PilY1 für eine stabile Typ IV Pilus-assoziierte Wirtszelladhäsion an die

basolateralen Oberflächen des humanen Lungengewebes *in vitro* nachgewiesen worden. Dies demonstriert, dass PilY1 primär als Adhäsion für die Bindung von *P. aeruginosa* an differenzierte alveoläre Epithelzellen fungiert (Heiniger *et al.*, 2010).

Darüber hinaus verfügt das *P. aeruginosa* PilY1 über ein Integrin-Bindungsmotiv oder Arginin-Glycine-Asparaginsäure (RGD) Motiv. Dieses bindet in Abhängigkeit von Ca^{2+} und des RGD-Motivs an $\alpha\text{V}\beta 5$ Integrine *in vitro*. Überdies sind sowohl das C-terminale Ca^{2+} -Bindungsmotiv als auch ein zweites Ca^{2+} -Motiv am N-Terminus der PilY Domäne in der Nähe des RGD-Motivs notwendig für die Integrinbindung (Johnson *et al.*, 2011). Integrine sind Transmembranproteine, spielen eine zentrale Rolle in der Zelladhäsion und vermitteln vielfältige interzelluläre sowie Zell-Zellmatrix Interaktionen. Ferner fungieren sie als Targets für zahlreiche pathogene Bakterien. $\alpha\text{V}\beta 5$ Integrine sind überdies in Epithelzellen zu finden (Pilewski *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2011; Iwamoto and Calderwood, 2015). Studien mit pathogenen *Neisseria* spp. und *K. kingae* zeigten ebenfalls einen großen Einfluss der PilY1-homologen Proteine PilC1/2 auf die Adhäsion an Epithelzellen. Insbesondere das Ca^{2+} -Bindungsmotiv innerhalb der C-terminalen PilY/PilC Domäne scheint hier maßgeblich für die Adhärenz zu sein (Kehl-Fie *et al.*, 2008; Porsch *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013). Die Bedeutung des C-Terminus ist konsistent mit den Beobachtungen aus *L. pneumophila*, hier vermittelt vorwiegend die PilY Domäne die Adhäsion an die entsprechenden Zielzellen. Hinzu kommt, dass Calcium- neben Magnesiumionen die Adhäsion von *L. pneumophila* an biotische und abiotische Oberflächen verstärken können (Koubar *et al.*, 2013).

In *P. aeruginosa* wird für die Funktion von PilY1 in der Adhäsion unter anderem ein Modell postuliert, in dem das Protein durch den Initiationskomplex PilVWX an der Pilusspitze lokalisiert ist. Durch die Interaktion mit Ca^{2+} kommt es zu einer Konformationsänderung des PilY1 Proteins, was zum einen die zur Adhäsion benötigte Oberfläche vergrößern oder präsentieren könnte. Zum anderen verhindert diese Konformationsänderung die vollständige Deploymerisierung des Typ IV Pilus und PilY1 verbleibt in der äußeren Membran für weitere Signaltransduktionsschritte. Überdies könnte eine veränderte Proteinstruktur auch die beiden Ca^{2+} -Bindungsmotive des *P. aeruginosa* PilY1 in direkte Nachbarschaft bringen und evtl. das RGD-Motiv zugänglich machen (Johnson *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2015; Nguyen *et al.*, 2015). Dieses Modell demonstriert zusätzlich die Bedeutung der Typ IV Pilus-Biogenese oder Stabilität für die Adhäsion an Wirtszellen und betont die Wichtigkeit eines Regulationsmechanismus, welcher den Übergang zwischen Motilität und Adhäsion während der Transmission steuert. Die zentrale Bedeutung der PilY Domäne ist zudem in Übereinstimmung mit den beobachteten Phänotypen des *L. pneumophila* PilY1 Proteins aus den Twitching Motility sowie Adhäsions- und Invasionsexperimenten.

Jedoch wird eine stabile Adhäsion nicht ausschließlich durch die Funktion oder das Vorhandensein von Typ IV Pili gewährleistet. So führt eine Mutation von PilY1 bei

P. aeruginosa in der Regel zu Pilus-negativen Stämmen. Dennoch wurden einige Adhäsionsexperimente von PilY1 in Typ IV Pilus-negativen Stämmen durchgeführt und können somit als Pilus-unabhängig bezeichnet werden. Für *X. fastidiosa* konnten ebenfalls Adhäsionseffekte für PilY1 beobachtet werden, obwohl PilY1 hier keinen Einfluss auf die Typ IV Bildung hat (De La Fuente *et al.*, 2007; Siryaporn *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2014; Leighton, Buensuceso, *et al.*, 2015).

So ist PilY unabhängig von der Funktion in der Typ IV Pilus-Biogenese in die Regulation der Oberflächen-aktivierten Virulenz von *P. aeruginosa* involviert. In diesem Zusammenhang wird die vWFA Domäne als ein potentielle mechanosensitive Domäne betrachtet, welche hervorgerufen durch mechanische Scherkräfte Oberflächen bzw. mögliche Zielzellen detektiert und dadurch eine Interaktion zwischen der äußeren Membran vermittelt. Dieser mögliche virulenzauslösende Mechanismus würde es *P. aeruginosa* ermöglichen mit einer Vielzahl Wirtszellen zu interagieren, unabhängig von wirtsspezifischen Faktoren und Epitopen (Siryaporn *et al.*, 2014; Ellison and Brun, 2015). Ein ähnlicher Mechanismus könnte für *L. pneumophila* eine Anpassung an die gegebene Vielzahl von Wirtszellen und Interaktionspartnern darstellen. Dies wäre sowohl konsistent mit der beobachteten PilY1-abhängigen Adhäsion in *D. discoideum* als auch in humanen Makrophagen und Lungenepithelzellen. Zudem konnte in den Adhäsionsexperimenten ebenfalls ein Einfluss der vWFA Domäne in der Bindung an Epithelzellen beobachtet werden.

Folglich könnte für die Funktion des PilY1 Proteins in der Adhäsion und Invasion von *L. pneumophila* neben dem starken Einfluss der C-terminalen PilY1 Domäne auch die vWFA Domäne als potentieller mechanosensitiver Regulator oder eine Ca^{2+} -Bindung in Betracht gezogen werden. Letztlich wäre auch eine mögliche Interaktion der entsprechenden Domänen denkbar, um somit auf spezifische Umweltreize, Lebensräume oder Zielzellen zu reagieren.

7.5. PilY1 ist beeinflusst in die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila*

Zu den zentralen Pathogenitäts-Mechanismen von *L. pneumophila* gehört die Fähigkeit die intrazellulären Signalkaskaden umzuprogrammieren und somit einer Degradation durch den endolysosomalen Abbauweg zu entgehen. So zeichnen sich die *L. pneumophila*-containing vacuoles (LCVs) der beiden Infektionssysteme *D. discoideum* und humane Makrophagen durch die folgenden zwei Eigenschaften aus. Erstens durch die Abwesenheit von endozytischen und lysosomalen Markern und zweitens durch die Assoziation mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum (Sturgill-Koszycki and Swanson, 2000; Derré and Isberg, 2004; Robinson and Roy, 2006). Dieser Prozess wird maßgeblich durch das Typ IV

oder Dot/Icm Sekretionssystem reguliert (Vogel *et al.*, 1998; Segal *et al.*, 1998; Isberg *et al.*, 2009).

Weiterführende Einblicke in die PilY1-Funktion für die Wirtszellinteraktion von *L. pneumophila* konnten in den Infektionsstudien mit humanen Makrophagen und Epithelzellen erzielt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass PilY1 die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* beeinflusst. Insbesondere in der Infektion von *D. discoideum* und Makrophagen wurde eine signifikante PilY1-abhängige Attenuation der intrazellulären Replikation beobachtet. Dieser PilY1-abhängige Phänotyp in umweltassoziierten und humanen Wirtszellsystemen ist ein weiterer Beleg für den Stellenwert von PilY1 für das intrazelluläre Überleben von *L. pneumophila*. Das verminderte Überleben der Bakterien könnte somit aus der attenuierten Replikation in den alveolaren Makrophagen und Epithelzellen resultieren. Dies wäre in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den HTLE-Infektionen. Der Einfluss von PilY1 bei einer respiratorischen Infektion beruht folglich neben der Adhäsion und Transmission innerhalb des Lungengewebes auch in der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila*.

Von Interesse ist ebenfalls, dass das *L. pneumophila* Toxin RtxA sowohl das frühe intrazelluläre Überleben sowie die Virulenz im Mausmodell, als auch die Adhäsion und Invasion beeinflusst (Cirillo *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass die attenuierte Replikation der *pilY1* Mutante kein vollständig sekundärer Effekt resultierend aus der verminderten Adhäsion und Invasion oder funktioneller Typ IV Pili ist. So konnte zwar für *L. pneumophila* ein Typ IV Pili bzw. PilE abhängiger Vorteil in der Kolonisierung von Lungengewebe und in der Adhäsion an humane Makrophagen und Epithelzellen gezeigt werden, aber der *pilE* Locus zeigt keinerlei Einfluss auf das intrazelluläre Überleben oder die Replikation in Makrophagen und Epithelzellen (Stone and Abu Kwaik, 1998). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die *pilY1*-negative mini-Tn10 Transposon Mutante in der *D. discoideum* Infektion eine signifikant gesteigerte Kolokalisation mit den lysosomalen Kompartimenten aufweist. Demnach scheint PilY1 zur Vermeidung der phagolysosomalen Fusion beizutragen. Dies ist konsistent mit dem vorrangegangenen Selektionsbedingungen des Transposonmuanten Screenings (Shevchuk *et al.*, 2014).

Ein weiterer Aspekt ist, dass die Dot/Icm Typ IV Sekretion im Zusammenhang zur Wirtszelladhäsion und Phagozytose steht. So wird die Effektor-Translokation in das Wirtszellcytoplasma durch Agentien, welche eine Depolymerisation der Actinfilamente inhibieren, unterbunden. *L. pneumophila* scheint somit den Phagozytoseprozess zu nutzen, um den für eine erfolgreiche Effektor-Translokation notwendigen engen Wirtszellkontakt herzustellen (Chen *et al.*, 2007; Charpentier *et al.*, 2009). Diese Abhängigkeit könnte als regulatorisches Element dienen, um zu gewährleisten, dass die energetisch aufwendige

Effektor-Translokation nur während einer Interaktion mit phagozytosekompetenten Wirtszellen stattfindet und somit zur Ausbildung einer zur Replikation geeigneten LCV führt. Hinzu kommt, dass die Typ IV oder Dot/Icm Effektor-Translokation bereits in den ersten Minuten der Infektion einsetzen muss, um die phagolysosomale Fusion effizient zu vermeiden (Green *et al.*, 1987; Roy *et al.*, 1998; Wiater *et al.*, 1998). Desweiteren wird davon ausgegangen, dass *L. pneumophila* im Zuge der Adhäsion die anschließende Phagozytose durch Dot/Icm Effektoren induzieren könnte (Hilbi *et al.*, 2001). Dass eine Komplementation von Dot/Icm-defizienten Mutanten durch Effektoren des Wildtyps nur innerhalb der ersten fünf Minuten der Infektion stattfinden kann, demonstriert zusätzlich die enge Verknüpfung der Adhäsion und Initiation der intrazellulären Replikation (Coers *et al.*, 1999).

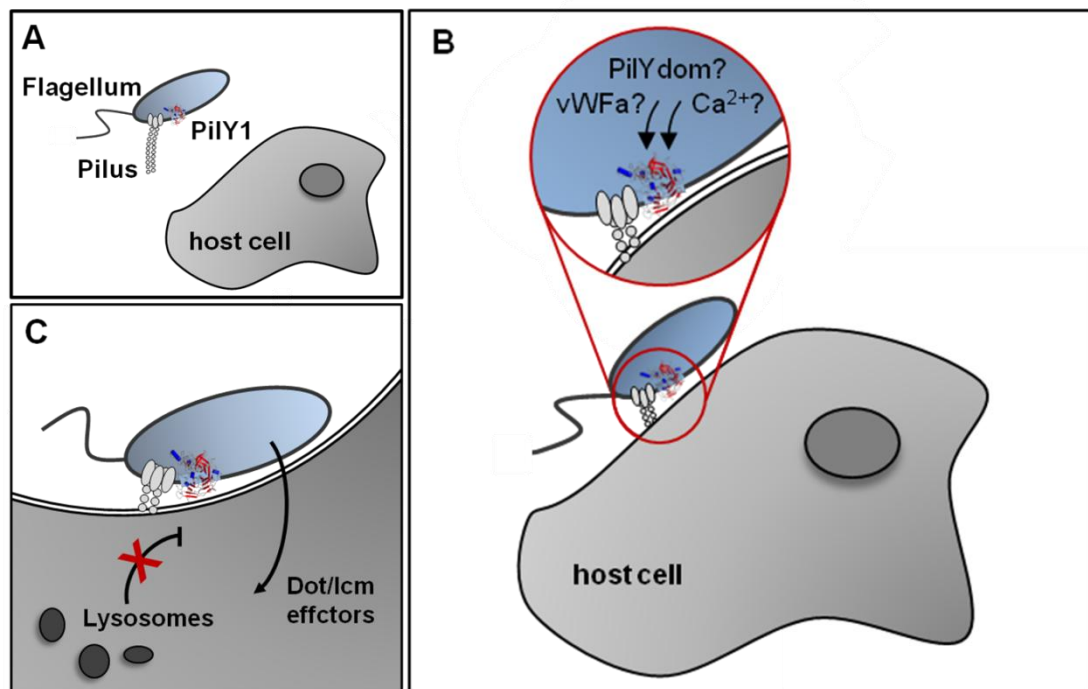


Abbildung 7.3: Schematische Darstellung der Funktionshypothese von PilY1 in der Pathogenität von *L. pneumophila*. (A) Das an der äußeren Membran lokalisierte PilY1 ist an der Typ IV Pilus Biogenese und Stabilität beteiligt und trägt zur Transmission von *L. pneumophila* bei. (B) PilY1 vermittelt direkt als Adhäsionsfaktor oder indirekt durch die Regulation der Pilus-Depolymerisation die Adhäsion an potentielle Wirtszellen. Die funktionellen Eigenschaften der vWFA- und der PilY Domäne sowie der Einfluss von Ca^{2+} konnten dabei nicht abschließend identifiziert werden. (C) Die Interaktion mit der Wirtszellmembran bewirkt zum einen die Internalisierung von *L. pneumophila* und gewährleistet gleichzeitig eine effiziente Dot/Icm Effektor-Translokation in die Wirtszelle. Dadurch ist PilY1 indirekt an der Etablierung der frühen LCV und der Vermeidung der phagolysosomalen Fusion beteiligt.

Interessanterweise konnte bei *P. aeruginosa* ein Einfluss des Typ IV Pilus-Biosyntheseapparats auf die Typ III Effektor-Sekretion in Epithelzellen beobachtet werden. Hier zeigte sich eine Abhängigkeit der Effizienz und Quantität in der Effektor-Translokation von der durch die PilT-ATPase vermittelten Pilus-Retraktion. Ähnliche Zusammenhänge mit dem Typ III Sekretionsapparat wurden auch für die Funktion des *P. aeruginosa* PilY1 in

der *in vitro* Infektion von humanen respiratorischen Epithelzellen festgestellt (Heiniger *et al.*, 2010; Shikata *et al.*, 2016). Auch die Typ IV abhängige Effektor Sekretion von *Vibrio cholerae* benötigt die Endozytose des Pathogenes durch die Wirtszelle (Ma *et al.*, 2009). Bakterielle Wirtszellinteraktionen in Abhängigkeit von Typ IV Pili sind ebenfalls bei enteropathogenen *E. coli* (EPEC) bekannt. In diesem Fall bewirkt die Depolymerisierung der bündelförmigen Pili eine effiziente Translokation der Effektoren des Typ III Sekretionsapparates während der Kolonisierung des Intestinaltrakts (Zahavi *et al.*, 2011).

PilY1 konnte somit in dieser Arbeit als multifunktionaler Virulenzfaktor identifiziert werden. Resultierend aus diesen Erkenntnissen lässt sich die folgende Funktionshypothese für das *L. pneumophila* Protein PilY1 formulieren, diese ist in der Abbildung 7.3 schematisch dargestellt. PilY1 fungiert in der Pathogenese von *L. pneumophila* als ein Adhäsionsfaktor, welcher sowohl die Adhäsion und Invasion an umweltassoziierte Protozoen als auch an humane Wirtszellen vermittelt. In diesem Zusammenhang könnte PilY1 zum einen direkt als Adhäsionsfaktor mit der Wirtszellmembran interagieren oder zum anderen indirekt durch die Regulation der Pilus-Depolymerisation Zell-Zell Kontakt erzeugen. An dieser Stelle konnte vor allem die C-terminale PilY Domäne als funktionsgebende Einheit des PilY1 Proteins identifiziert werden. Die vWFA Domäne, als potentieller mechanosensitiver Regulator, sowie eine Ca^{2+} -Interaktion könnten diese funktionellen Eigenschaften von PilY1 zusätzlich beeinflussen. Überdies kann PilY1 als Adhäsionsfaktor nicht nur die Phagozytose beeinflussen, sondern in der frühen Phase der *L. pneumophila* Infektion zur erfolgreichen Etablierung der LCV beizutragen. Der durch PilY1 vermittelte enge Wirtszellkontakt gewährleistet dabei eine effiziente Dot/Icm Effektor-Translokation. Diese Hypothese verbindet zudem die vielfältigen Phänotypen des *L. pneumophila* PilY1 Proteins in der Oberflächentranslokation, der Wirtszellinteraktion sowie der intrazellulären Replikation.

Die Adhäsion wird überdies als ein zentraler Faktor in der *L. pneumophila* Pathogenität identifiziert. Diese ist maßgeblich an der Etablierung einer humanen Infektion beteiligt. In diesem Zusammenhang trägt PilY1 auf der einen Seite extrazellulär zur Kolonisierung des Gewebes und der Wirtszellinteraktion bei und auf der anderen Seite intrazellulär zur Ausbildung der frühen LCV.

7.6. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte PilY1 als neuer Virulenzfaktor von *L. pneumophila* identifiziert werden, welcher an der Initiation der Infektion beteiligt ist. Dieser Initiation können drei zentrale Mechanismen zugeordnet werden, die Transmission, die Adhäsion sowie die anschließende Internalisierung und die Etablierung der frühen LCV.

Im Rahmen der Transmission konnte nachgewiesen werden, dass PilY1 in die Oberflächentranslokation und hier insbesondere in die Twitching- und Sliding Motility involviert ist. Jedoch konnte bislang keine direkte Beteiligung von PilY1 an Typ IV Pilus-Biogenese von *L. pneumophila* gezeigt werden. Gleiches gilt für die potentielle Interaktion mit der PilT-ATPase, wie es bei *P. aeruginosa* und den pathogenen *Neisseria* spp. beobachtet werden konnte (Morand *et al.*, 2004; Orans *et al.*, 2010; Heiniger *et al.*, 2010). Ein Nachweis im Bezug auf die Typ IV Pilus-Expression könnte biochemisch durch Westernblot Analysen oder durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden. Zusätzlich können so weitere Informationen zur Lokalisation und räumlichen Nähe potenzieller Interaktionspartner von PilY1 generiert werden. Somit könnten zentrale Erkenntnisse zur Typ IV Pilus-Biogenese von *L. pneumophila* gewonnen werden, welche bislang in weiten Teilen unerforscht ist. So ist auch der Nachweis der Pilus-Expression nur selten erfolgt und für die Komponenten der Typ IV Pilus-Biogenese insbesondere für PilE und PilA stehen noch keine Antikörper zur Verfügung (Rodgers *et al.*, 1980; Liles *et al.*, 1998; Stone and Abu Kwaik, 1998).

Darüber hinaus ist eine weiterführende Analyse der Transmission im humanen Lungengewebe von großem Interesse. Hier könnte durch histologische Studien der Einfluss von PilY1 und evtl. der Typ IV Pili auf die Interaktion mit den alveolaren Oberflächen untersucht werden. Zudem würde dies weitere Einblicke in die PilY1-abhängigen Adhäsionsprozesse mit den Zellen des humanen Lungengewebes ermöglichen. Um die Funktion von PilY1 als Adhäsionsfaktor weiter zu definieren, können durch Immunpräzipitationsexperimente mögliche Bindungspartner auf der Wirtszellseite identifiziert werden. Dies würde aufklären, ob eine direkte Interaktion von PilY1 mit der Wirtszellmembran stattfindet oder ob ein indirekter Einfluss durch die Regulation der Pilus-Depolymerisation zur Erzeugung des Zell-Zell Kontakts vorliegt.

In dieser Arbeit wurde diskutiert, dass die Adhäsions- und Internalisierungsprozesse von *L. pneumophila* in enger oder evtl. direkter Abhängigkeit zur erfolgreichen Dot/Icm Effektor-Translokation stehen. PilY1 könnte demnach als Adhäsionsfaktor in der frühen Phase der *L. pneumophila* Infektion zur Etablierung der LCV beitragen, indem durch engen Wirtszellkontakt eine Effektor-Translokation gewährleistet wird. Um diese Hypothese zu belegen muss die Dot/Icm Effektor-Translokation z.B. durch Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Experimente nachgewiesen werden. Vergleichbare Studien sind für *L. pneumophila* und *P. aeruginosa* mittels β -Lactamase-Fusionsproteinen bereits durchgeführt worden (Charpentier *et al.*, 2009; Shikata *et al.*, 2016). Damit einhergehend müsste der Einfluss von PilY1 auf die Etablierung der frühen LCV und die intrazellulären Signalwege weiter untersucht werden. Hierzu können, ergänzend zu den

phagolysosomalen Kollokalisationsexperimenten, mikroskopische Untersuchungen im Hinblick auf eine resultierende Ansäuerung der LCV durchgeführt werden.

In diesen Prozessen konnte bereits der Einfluss der vWFa bzw. der PilY1 Domäne des PilY1 Proteins differenziert werden. Hier konnte für die homologen Proteine von *P. aeruginosa*, *K. kingae* und *N. gonorrhoeae* eine Ca^{2+} -Interaktion beobachtet werden, welche zur Adhäsion und Motilität beiträgt (Orans *et al.*, 2010; Porsch *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2013). Im diesem Zusammenhang könnten weiterführende biochemische Nachweismethoden oder die Strukturaufklärung durch Kristallisation der PilY1 Domäne, detaillierte Information zu den molekularen Regulationsmechanismen und Interaktionen liefern.

Die vWFa Domäne des PilY1 Proteins von *P. aeruginosa* wird als möglicher Mechanosensor beschrieben, welcher an der Detektion von Oberflächen und Zielzellen und der einhegenden Expression von Virulenzgenen beteiligt ist (Siryaporn *et al.*, 2014; Persat *et al.*, 2015). Eine vergleichbare Funktion für *L. pneumophila* könnte durch Transkriptomanalysen mit funktionellen Mutanten aufgeklärt werden. In diesem Kontext könnten ebenfalls weitere Informationen zur oberflächen-abhängigen Sliding- und Twitching Motility Regulation generiert werden. Abschließend könnte dies aufklären, ob PilY1 in der Initiation der Infektion vorwiegend strukturelle Funktionen im Bezug auf die Detektion und Bindung an Zielzellen oder regulatorische Eigenschaften auf die Signaltransduktion von *L. pneumophila* hat.

8. Anhang

8.1. Vektorkarten

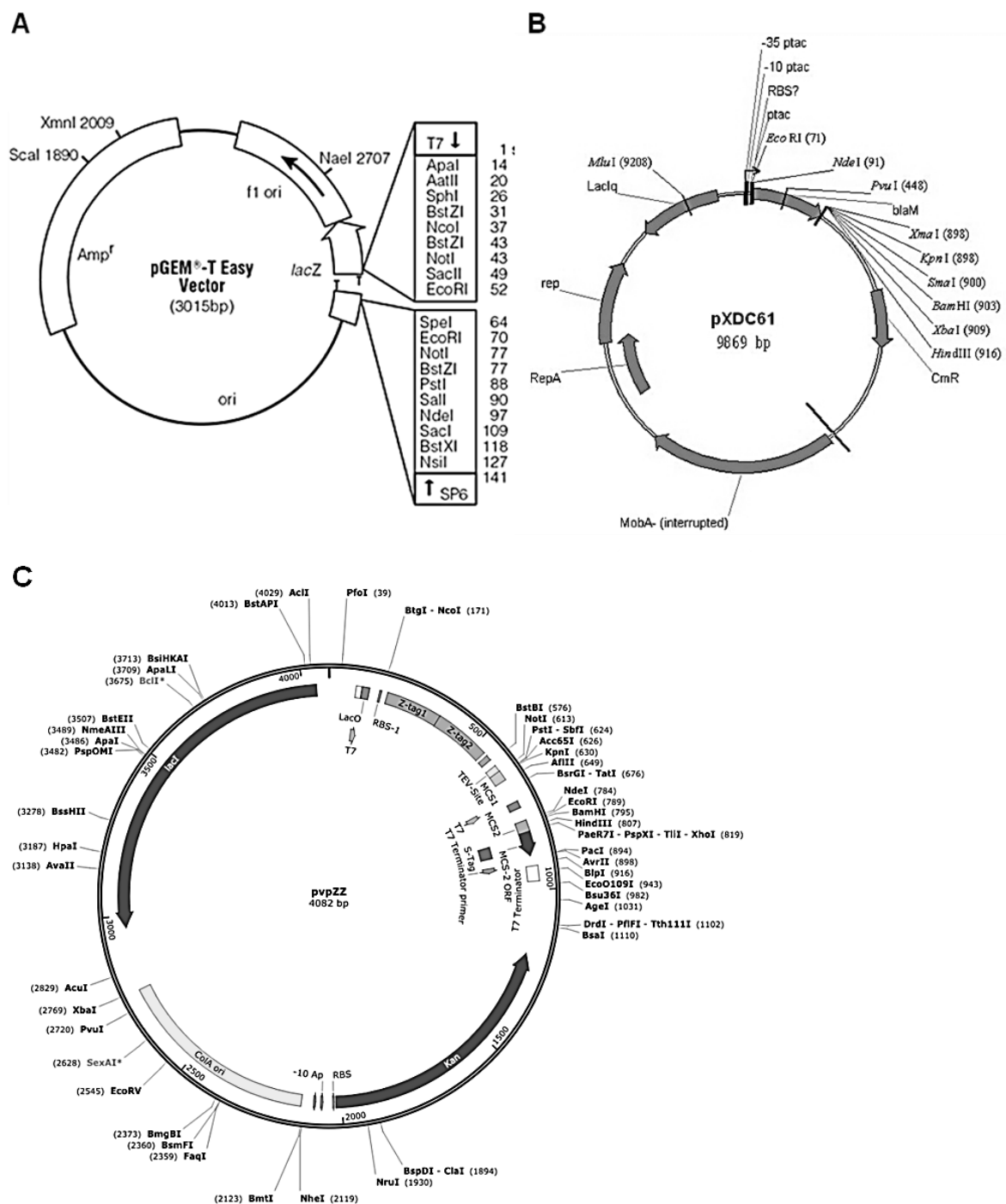


Abbildung 8.1: Vektorkarten der zur Mutagenese verwendeten Vektoren. (A) Vektorkarte pGEM®-T (Promega). (B) Vektorkarte pXDC61 (Charpentier *et al.*, 2009). (C) Vektorkarte pvp008ZZ (Jörn Krause; Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung).

8.2. Sekretom Analyse der *L. pneumophila pilY1* negativen Mutante

Tabelle 8.1: Im Sekretom signifikant akkumulierte Proteine

Accession	Locus	Beschreibung	SignalP	Accumuliert
YP001249366.1	LPC_0020	hemagglutinin/protease	cs	D1 ²
YP001249388.1	LPC_0042	hypothetical protein	ns	D1 ²
YP001250102.1	glnA	glutamine synthetase	ns	D1 ²
YP001250270.1	prpD	2-methylcitrate dehydratase	ns	WT ²
YP001250388.1	LPC_1075	hypothetical protein	ns	WT ²
YP001250455.1	tsf	elongation factor Ts	ns	D1 ²
YP001250637.1	LPC_1337	lipase	ns	WT ²
YP001250715.1	LPC_1418	3',5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase	ns	D1 ²
YP001250736.1	LPC_1440	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	cs	D1 ²
YP001250753.1	LPC_1458	organic hydroperoxide resistance protein OsmC	ns	WT ²
YP001251267.1	dut	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	ns	WT ²
YP001251599.1	LPC_2331	hypothetical protein	cs	WT ²
YP001251673.1	dapD	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-carboxylate N-succinyltransferase	ns	D1 ²
YP001251686.1	LPC_2419	hypothetical protein	cs	WT ²
YP001251790.1	LPC_2529	hypothetical protein	cs	WT
YP001251909.1	LPC_2649	hypothetical protein	ns	D1 ²
YP001251959.1	LPC_2701	hypothetical protein	cs	WT ²³
YP001252151.1	LPC_2904	hypothetical protein	ns	D1 ²
YP001252339.1	LPC_3106	tyrosine phosphatase II superfamily transporter protein	cs	WT ²
YP001252499.1	cysK	cystathionine beta synthase	ns	WT ²
YP001252124.1	LPC_2877	proA	cs	WT ¹
YP001251599.1	LPC_2331	hypothetical protein	cs	WT ¹²
YP001250698.1	LPC_1400	hypothetical protein	cs	WT ¹
YP001250798.1	LPC_1503	serine metalloprotease	cs	WT ¹
YP001250954.1	LPC_1671	hypothetical protein	cs	D1 ³
YP001252289.1	LPC_3053	Polynucleotide phosphorylase (PNPase)	ns	WT ³
YP001251313.1	LPC_2037	NADPH-dependent FMN reductase	no	WT ³
YP001251751.1	LPC_2486	hypothetical protein	no	WT ³
YP001250079.1	LPC_0756	Flagellin_C	no	WT ³

1: Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese identifiziert wurden

2: Proteine, die mittels Orbitrap identifiziert wurden

3: Proteine, die mittels Synapt identifiziert wurden

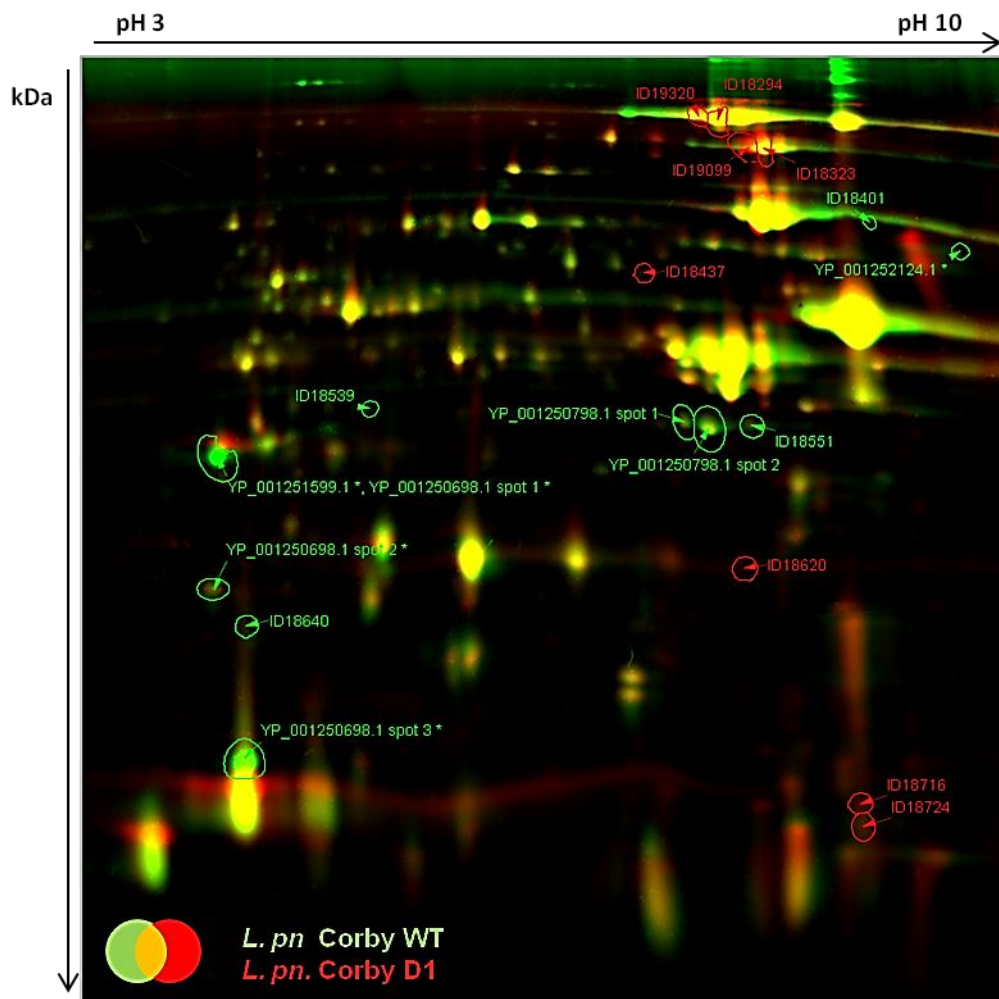


Abbildung 8.2: Unterschiedlich sezernierte Proteine der *L. pneumophila pilY1* negativen mini-Tn10 Transposonmutante D1 im Vergleich zum *L. pneumophila* Corby WT. Dargestellt ist die Analyse der 2D Gelelektrophorese der Sekretome aus der stationären Wachstumsphase des des *L. pneumophila* Corby WT und der *pilY1* negativen Transposonmutante D1. Die Proteinprofile des *L. pneumophila* Corby WT wurden in grün dargestellt und die der *pilY1* negativen Transposonmutante D1 in rot. Die Quantifizierung der Proteinspots wurde mit dem Programm Delta 2D (Decodon) durchgeführt und die signifikant regulierten Proteinspots wurden markiert und massenspektroskopisch identifiziert.

8.3. Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
bp	Basepaare
BCYE	Gepufferter Kohle-Hefe Extrakt, <i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Rinderalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFU	Kolonie-bildende Einheit, <i>Colony Forming Unit</i>
Cm	Chloramphenicol
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonuklotidtriphosphat
<i>dot/icm</i>	<i>defect in organelle trafficking / intracellular multiplication</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
kb	Kilobasen (1 kb = 1000 bp)
kDa	Kilodalton (1 kDa = 1000 g/mol)
Km	Kanamycin
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
LB	Lysogeny Broth
LCV	<i>Legionella</i> -enthaltende Vakuole, <i>Legionella containing vacuole</i>
LGB	<i>Legionella</i> Genom Browser
LLAP	<i>Legionella</i> -like Amoebal Pathogens
LPS	Lipopolysaccharid
<i>lsp</i>	<i>legionella secretion pathway</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MilliQ	vollentsalztes Wasser
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
MOI	Infektionsmultiplikator, <i>Multiplication of Infection</i>
MST	<i>Magnetic Separation Technology</i>
NaOH	Natronlauge
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm

OD	Optische Dichte
OMV	Äußere Membran Vesikel, <i>Outer Membrane Vesikel</i>
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
RKI	Robert-Koch Institut
RT	Raumtemperatur
<i>rtx</i>	<i>repeats in structural toxin genes</i>
sek	Sekunde
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tn	Transposon
üN	über Nacht
VBNC	<i>viable but not culturable</i>
YEB	yeast extract broth
Zeo	Zeocin [™]

8.4. Literaturverzeichnis

- Aas, F.E., Løvold, C., and Koomey, M. (2002) An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action and links to Type IV pilus expression. *Mol Microbiol* **46**: 1441–1450.
- Abdelhady, H., and Garduño, R.A. (2013) The progeny of *Legionella pneumophila* in human macrophages shows unique developmental traits. *FEMS Microbiol Lett* **349**: 99–107.
- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Prashar, A., Rao, C., Ginevra, C., Jarraud, S., *et al.* (2014) The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation, and pathogen-phagocyte interactions. *Appl Environ Microbiol* **80**: 1441–1454.
- Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M., *et al.* (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new Legionella species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1151–1160.
- Aho, E.L., Botten, J.W., Hall, R.J., Larson, M.K., and Ness, J.K. (1997) Characterization of a class II pilin expression locus from *Neisseria meningitidis*: evidence for increased diversity among pilin genes in pathogenic *Neisseria* species. *Infect Immun* **65**: 2613–2620.
- Alarcon, I., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2009) The role of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* exit from and translocation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 2237–2244.
- Alix, E., Chesnel, L., Bowzard, B.J., Tucker, A.M., Delprato, A., Cherfils, J., *et al.* (2012) The capping domain in RalF regulates effector functions. *PLoS Pathog* **8**: e1003012.
- Al-Khodori, S., Price, C.T., Habyarimana, F., Kalia, A., and Abu Kwaik, Y. (2008) A Dot/Icm-translocated ankyrin protein of *Legionella pneumophila* is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol Microbiol* **70**: 908–923.
- Allard, K.A., Viswanathan, V.K., and Cianciotto, N.P. (2006) IbtA and IbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J Bacteriol* **188**: 1351–1363.
- Allen, J.G., Myatt, T.A., Macintosh, D.L., Ludwig, J.F., Minegishi, T., Stewart, J.H., *et al.* (2012) Assessing risk of health care-acquired Legionnaires' disease from environmental sampling: the limits of using a strict percent positivity approach. *Am J Infect Control* **40**: 917–921.
- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C., and Frère, J. (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* **57**: 497–502.
- Alli, O.A., Gao, L.Y., Pedersen, L.L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., and Abu Kwaik, Y. (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **68**: 6431–6440.
- Alm, R.A., Hallinan, J.P., Watson, A.A., and Mattick, J.S. (1996) Fimbrial biogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa*: *pilW* and *pilX* increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and *pilY1* encodes a gonococcal PilC homologue. *Mol Microbiol* **22**: 161–173.
- Alm, R.A., and Mattick, J.S. (1996) Identification of two genes with prepilin-like leader sequences involved in type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**: 3809–3817.
- Almeida, R.P.P., and Purcell, A.H. (2003) Transmission of *Xylella fastidiosa* to grapevines by *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). *J Econ Entomol* **96**: 264–271.

- Anesti, V., McDonald, I.R., Ramaswamy, M., Wade, W.G., Kelly, D.P., and Wood, A.P. (2005) Isolation and molecular detection of methylotrophic bacteria occurring in the human mouth. *Environ Microbiol* **7**: 1227–1238.
- Aragon, V., Kurtz, S., Flieger, A., Neumeister, B., and Cianciotto, N.P. (2000) Secreted enzymatic activities of wild-type and *pilD*-deficient *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **68**: 1855–1863.
- Arasaki, K., Toomre, D.K., and Roy, C.R. (2012) The *Legionella pneumophila* effector DrrA is sufficient to stimulate SNARE-dependent membrane fusion. *Cell Host Microbe* **11**: 46–57.
- Arts, J., Boxtel, R. van, Filloux, A., Tommassen, J., and Koster, M. (2007) Export of the pseudopilin XcpT of the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion system via the signal recognition particle-Sec pathway. *J Bacteriol* **189**: 2069–2076.
- Aurass, P., Schlegel, M., Metwally, O., Harding, C.R., Schroeder, G.N., Frankel, G., and Flieger, A. (2013) The *Legionella pneumophila* Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi. *J Biol Chem* **288**: 11080–11092.
- Ayers, M., Sampaleanu, L.M., Tammam, S., Koo, J., Harvey, H., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2009) PilM/N/O/P proteins form an inner membrane complex that affects the stability of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *J Mol Biol* **394**: 128–142.
- Banerji, S., Aurass, P., and Flieger, A. (2008) The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* – Identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int J Med Microbiol* **298**: 169–181.
- Banerji, S., Bewersdorff, M., Hermes, B., Cianciotto, N.P., and Flieger, A. (2005) Characterization of the major secreted zinc metalloprotease-dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlcC, of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **73**: 2899–2909.
- Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W.-X., Chen, L., and Luo, Z.-Q. (2007) *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 5121–5126.
- Bardill, J.P., Miller, J.L., and Vogel, J.P. (2005) IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **56**: 90–103.
- Basmaci, R., Ilharreborde, B., Bidet, P., Doit, C., Lorrot, M., Mazda, K., et al. (2012) Isolation of *Kingella kingae* in the oropharynx during *K. kingae* arthritis in children. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **18**: E134–136.
- Baum, H. von, Ewig, S., Marre, R., Suttrop, N., Gonschior, S., Welte, T., et al. (2008) Community-acquired *Legionella pneumonia*: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **46**: 1356–1364.
- Beaussart, A., Baker, A.E., Kuchma, S.L., El-Kirat-Chatel, S., O'Toole, G.A., and Dufrêne, Y.F. (2014) Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili. *ACS Nano* **8**: 10723–10733.
- Be'er, A., Smith, R.S., Zhang, H.P., Florin, E.-L., Payne, S.M., and Swinney, H.L. (2009) *Paenibacillus dendritiformis* bacterial colony growth depends on surfactant but not on bacterial motion. *J Bacteriol* **191**: 5758–5764.
- Behnia, R., and Munro, S. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**: 597–604.
- Bellinger-Kawahara, C., and Horwitz, M.A. (1990) Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med* **172**: 1201–1210.

- Bender, J., Rydzewski, K., Broich, M., Schunder, E., Heuner, K., and Flieger, A. (2009) Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. *J Biol Chem* **284**: 27185–27194.
- Benson, R.F., and Fields, B.S. (1998) Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* **13**: 90–99.
- Berendt, R.F. (1980) Survival of *Legionella pneumophila* in aerosols: effect of relative humidity. *J Infect Dis* **141**: 689.
- Berger, K.H., and Isberg, R.R. (1993) Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **7**: 7–19.
- Berger, K.H., Merriam, J.J., and Isberg, R.R. (1994) Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene. *Mol Microbiol* **14**: 809–822.
- Bergeron, J.R.C., and Sgourakis, N.G. (2015) Type IV pilus: one architectural problem, many structural solutions. *Struct Lond Engl* 1993 **23**: 253–255.
- Bernard, S.C., Simpson, N., Join-Lambert, O., Federici, C., Laran-Chich, M.-P., Maïssa, N., *et al.* (2014) Pathogenic *Neisseria meningitidis* utilizes CD147 for vascular colonization. *Nat Med* **20**: 725–731.
- Berry, J.-L., and Pelicic, V. (2015) Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives. *FEMS Microbiol Rev* **39**: 134–154.
- Biais, N., Ladoux, B., Higashi, D., So, M., and Sheetz, M. (2008) Cooperative retraction of bundled type IV pili enables nanonewton force generation. *PLoS Biol* **6**: e87.
- Bohn, Y.-S.T., Brandes, G., Rakhimova, E., Horatzek, S., Salunkhe, P., Munder, A., *et al.* (2009) Multiple roles of *Pseudomonas aeruginosa* TBCF10839 PilY1 in motility, transport and infection. *Mol Microbiol* **71**: 730–747.
- Booy, R., and Kroll, J.S. (1998) Bacterial meningitis and meningococcal infection. *Curr Opin Pediatr* **10**: 13–18.
- Bozue, J.A., and Johnson, W. (1996) Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**: 668–673.
- Brodhun, B., and Buchholz, U. (2011) [Epidemiology of Legionnaires' disease in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **54**: 680–687.
- Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S.S., Kami, K., Overduin, M., and Hilbi, H. (2009) Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J Biol Chem* **284**: 4846–4856.
- Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.-A., Gouyette, C., *et al.* (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **8**: 1228–1240.
- Bugalhão, J.N., Mota, L.J., and Franco, I.S. (2016) Identification of regions within the *Legionella pneumophila* VipA effector protein involved in actin binding and polymerization and in interference with eukaryotic organelle trafficking. *MicrobiologyOpen* **5**: 118–133.
- Burrows, L.L. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol* **66**: 493–520.

- Byrd, T.F., and Horwitz, M.A. (2000) Aberrantly low transferrin receptor expression on human monocytes is associated with nonpermissiveness for *Legionella pneumophila* growth. *J Infect Dis* **181**: 1394–1400.
- Cambronne, E.D., and Roy, C.R. (2007) The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog* **3**: e188.
- Campos, M., Francetic, O., and Nilges, M. (2011) Modeling pilus structures from sparse data. *J Struct Biol* **173**: 436–444.
- Carvalho, T.M.U. de, Barrias, E.S., and Souza, W. de (2015) Macropinocytosis: a pathway to protozoan infection. *Front Physiol* **6**: 106.
- Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., et al. (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**: 1165–1173.
- Chamot-Rooke, J., Mikaty, G., Malosse, C., Soyer, M., Dumont, A., Gault, J., et al. (2011) Posttranslational modification of pili upon cell contact triggers *N. meningitidis* dissemination. *Science* **331**: 778–782.
- Chang, B., Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Koizumi, N., and Watanabe, H. (2005) Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **73**: 4272–4280.
- Charpentier, X., Gabay, J.E., Reyes, M., Zhu, J.W., Weiss, A., and Shuman, H.A. (2009) Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* **5**: e1000501.
- Chatfield, C.H., and Cianciotto, N.P. (2007) The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. *Infect Immun* **75**: 4062–4070.
- Chatfield, C.H., Mulhern, B.J., Burnside, D.M., and Cianciotto, N.P. (2011) *Legionella pneumophila* LbtU acts as a novel, TonB-independent receptor for the legiobactin siderophore. *J Bacteriol* **193**: 1563–1575.
- Chen, J., Felipe, K.S. de, Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G., and Shuman, H.A. (2004) *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**: 1358–1361.
- Chen, J., Reyes, M., Clarke, M., and Shuman, H.A. (2007) Host cell-dependent secretion and translocation of the LepA and LepB effectors of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **9**: 1660–1671.
- Chen, Y., and Machner, M.P. (2013) Targeting of the small GTPase Rab6A' by the *Legionella pneumophila* effector LidA. *Infect Immun* **81**: 2226–2235.
- Cheng, Y., Johnson, M.D.L., Burillo-Kirch, C., Mocny, J.C., Anderson, J.E., Garrett, C.K., et al. (2013) Mutation of the conserved calcium-binding motif in *Neisseria gonorrhoeae* PilC1 impacts adhesion but not piliation. *Infect Immun* **81**: 4280–4289.
- Chiang, P., Habash, M., and Burrows, L.L. (2005) Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus ATPases involved in twitching motility. *J Bacteriol* **187**: 829–839.
- Chiang, P., Sampaleanu, L.M., Ayers, M., Pahuta, M., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2008) Functional role of conserved residues in the characteristic secretion NTPase motifs of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus motor proteins PilB, PilT and PilU. *Microbiol Read Engl* **154**: 114–126.

- Chometon, S., Benito, Y., Chaker, M., Boisset, S., Ploton, C., Bérard, J., *et al.* (2007) Specific real-time polymerase chain reaction places *Kingella kingae* as the most common cause of osteoarticular infections in young children. *Pediatr Infect Dis J* **26**: 377–381.
- Cianciotto, N.P. (2007) Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **20**: 323–331.
- Cianciotto, N.P. (2009) Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol* **4**: 797–805.
- Cianciotto, N.P., and Fields, B.S. (1992) *Legionella pneumophila mip* gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5188–5191.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **67**: 4427–4434.
- Cirillo, S.L., Bermudez, L.E., El-Etr, S.H., Duhamel, G.E., and Cirillo, J.D. (2001) *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infect Immun* **69**: 508–517.
- Cirillo, S.L., Lum, J., and Cirillo, J.D. (2000) Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiol Read Engl* **146** (Pt 6): 1345–1359.
- Cirillo, S.L.G., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M.M., and Cirillo, J.D. (2002) Role of the *Legionella pneumophila rtxA* gene in amoebae. *Microbiol Read Engl* **148**: 1667–1677.
- Cisneros, D.A., Bond, P.J., Pugsley, A.P., Campos, M., and Francetic, O. (2012) Minor pseudopilin self-assembly primes type II secretion pseudopilus elongation. *EMBO J* **31**: 1041–1053.
- Cisneros, D.A., Pehau-Arnaudet, G., and Francetic, O. (2012) Heterologous assembly of type IV pili by a type II secretion system reveals the role of minor pilins in assembly initiation. *Mol Microbiol* **86**: 805–818.
- Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A. (2000) Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. *Infect Immun* **68**: 2671–2684.
- Coers, J., Monahan, C., and Roy, C.R. (1999) Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat Cell Biol* **1**: 451–453.
- Coil, D.A., and Anné, J. (2009) Twitching motility in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett* **293**: 271–277.
- Coil, D.A., and Anné, J. (2010) The role of *fimV* and the importance of its tandem repeat copy number in twitching motility, pigment production, and morphology in *Legionella pneumophila*. *Arch Microbiol* **192**: 625–631.
- Colombatti, A., Bonaldo, P., and Doliana, R. (1993) Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix Stuttg Ger* **13**: 297–306.
- Comolli, J.C., Hauser, A.R., Waite, L., Whitchurch, C.B., Mattick, J.S., and Engel, J.N. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **67**: 3625–3630.
- Conover, G.M., Martinez-Morales, F., Heidtman, M.I., Luo, Z.-Q., Tang, M., Chen, C., *et al.* (2008) Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. *Cell Microbiol* **10**: 514–528.

- Coureuil, M., Lécuyer, H., Scott, M.G.H., Boularan, C., Enslen, H., Soyer, M., *et al.* (2010) Meningococcus Hijacks a β 2-adrenoceptor/ β -Arrestin pathway to cross brain microvasculature endothelium. *Cell* **143**: 1149–1160.
- Craig, L., and Li, J. (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 267–277.
- Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 363–378.
- Craig, L., Taylor, R.K., Pique, M.E., Adair, B.D., Arvai, A.S., Singh, M., *et al.* (2003) Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol Cell* **11**: 1139–1150.
- Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H., and Tainer, J.A. (2006) Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* **23**: 651–662.
- Creasey, E.A., and Isberg, R.R. (2012) The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3481–3486.
- Cruz, L.F., Parker, J.K., Cobine, P.A., and De La Fuente, L. (2014) Calcium-Enhanced Twitching Motility in *Xylella fastidiosa* Is Linked to a Single PilY1 Homolog. *Appl Environ Microbiol* **80**: 7176–7185.
- Cunha, B.A., Burillo, A., and Bouza, E. (2015) Legionnaires' disease. *Lancet Lond Engl*.
- Dalebroux, Z.D., Edwards, R.L., and Swanson, M.S. (2009) SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol Microbiol* **71**: 640–658.
- Dalebroux, Z.D., Yagi, B.F., Sahr, T., Buchrieser, C., and Swanson, M.S. (2010) Distinct roles of ppGpp and DksA in *Legionella pneumophila* differentiation. *Mol Microbiol* **76**: 200–219.
- D'Auria, G., Jiménez, N., Peris-Bondia, F., Pelaz, C., Latorre, A., and Moya, A. (2008) Virulence factor *rtx* in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics* **9**: 14.
- D'Auria, G., Jiménez-Hernández, N., Peris-Bondia, F., Moya, A., and Latorre, A. (2010) *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics* **11**: 181.
- Davis, J.M., and Peel, M.M. (1982) Osteomyelitis and septic arthritis caused by *Kingella kingae*. *J Clin Pathol* **35**: 219–222.
- De La Fuente, L., Galvani, C.D., Cursino, L., Burr, T.J., and Hoch, H.C. (2007) *Xylella fastidiosa* movement and biofilm formation studied in artificial xylem vessels. In *Phytopathology*. AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA, pp. S26–S26.
- Debroy, S., Aragon, V., Kurtz, S., and Cianciotto, N.P. (2006) *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect Immun* **74**: 5152–5160.
- Declerck, P. (2010) Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **12**: 557–566.
- Degtyar, E., Zusman, T., Ehrlich, M., and Segal, G. (2009) A *Legionella* effector acquired from protozoa is involved in sphingolipids metabolism and is targeted to the host cell mitochondria. *Cell Microbiol* **11**: 1219–1235.

- Den Boer, J.W., Yzerman, E.P.F., Schellekens, J., Lettinga, K.D., Boshuizen, H.C., Van Steenberghe, J.E., *et al.* (2002) A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis* **8**: 37–43.
- Derbise, A., Lesic, B., Dacheux, D., Ghigo, J.M., and Carniel, E. (2003) A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 113–116.
- Derré, I., and Isberg, R.R. (2004) *Legionella pneumophila* replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system. *Infect Immun* **72**: 3048–3053.
- Derré, I., and Isberg, R.R. (2005) LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infect Immun* **73**: 4370–4380.
- Déziel, E., Comeau, Y., and Villemur, R. (2001) Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* **183**: 1195–1204.
- Diederer, B.M.W. (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* **56**: 1–12.
- Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B.C., Hacker, J., and Steinert, M. (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect Immun* **69**: 2116–2122.
- Dominguez, A., Alvarez, J., Sabria, M., Carmona, G., Torner, N., Oviedo, M., *et al.* (2009) Factors influencing the case-fatality rate of Legionnaires' disease. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung Dis* **13**: 407–412.
- Domínguez, D.C., Guragain, M., and Patrauchan, M. (2015) Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium* **57**: 151–165.
- Drawert, Frederike (2013) *Legionella*-Wirtszell-Interaktionen und Analyse neuer Wirkstoffe und Wirkstoffträger; Dissertation.
- Dreyfus, L.A., and Iglewski, B.H. (1986) Purification and characterization of an extracellular protease of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **51**: 736–743.
- Drömann, D., Rupp, J., Rohmann, K., Osbahr, S., Ulmer, A.J., Marwitz, S., *et al.* (2010) The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Respir Res* **11**: 67.
- DSMZ. (2016). Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date-*Legionella*. [WWW document].URL https://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?species=pneumophila&bnu_no=784113#784113
- Duncan, C., Prashar, A., So, J., Tang, P., Low, D.E., Terebiznik, M., and Guyard, C. (2011) Lcl of *Legionella pneumophila* is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation. *Infect Immun* **79**: 2168–2181.
- Edelstein, P.H. (2007) Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **44**: 229–231.
- Edwards, R.L., Dalebroux, Z.D., and Swanson, M.S. (2009) *Legionella pneumophila* couples fatty acid flux to microbial differentiation and virulence. *Mol Microbiol* **71**: 1190–1204.
- Ellis, T.N., and Kuehn, M.J. (2010) Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **74**: 81–94.
- Ellison, C., and Brun, Y.V. (2015) Mechanosensing: a regulation sensation. *Curr Biol CB* **25**: R113–115.

- Emanuelsson, O., Brunak, S., Heijne, G. von, and Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**: 953–971.
- Epalle, T., Girardot, F., Allegra, S., Maurice-Blanc, C., Garraud, O., and Riffard, S. (2015) Viable but not culturable forms of *Legionella pneumophila* generated after heat shock treatment are infectious for macrophage-like and alveolar epithelial cells after resuscitation on *Acanthamoeba polyphaga*. *Microb Ecol* **69**: 215–224.
- Eriksson, J., Eriksson, O.S., Maudsdotter, L., Palm, O., Engman, J., Sarkissian, T., *et al.* (2015) Characterization of motility and piliation in pathogenic *Neisseria*. *BMC Microbiol* **15**: 92.
- European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013 Legionnaires' disease in Europe. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/legionnaires-disease-in-europe-2011.pdf>; 2011. (Stockholm, April 2013)
- Eylert, E., Herrmann, V., Jules, M., Gillmaier, N., Lautner, M., Buchrieser, C., *et al.* (2010) Isotopologue profiling of *Legionella pneumophila*: role of serine and glucose as carbon substrates. *J Biol Chem* **285**: 22232–22243.
- Faucher, S.P., Mueller, C.A., and Shuman, H.A. (2011) *Legionella pneumophila* Transcriptome during Intracellular Multiplication in Human Macrophages. *Front Microbiol* **2**: 60.
- Felipe, K.S. de, Pampou, S., Jovanovic, O.S., Pericone, C.D., Ye, S.F., Kalachikov, S., and Shuman, H.A. (2005) Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer. *J Bacteriol* **187**: 7716–7726.
- Fernandez-Moreira, E., Helbig, J.H., and Swanson, M.S. (2006) Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. *Infect Immun* **74**: 3285–3295.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., *et al.* (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* **42**: D222–230.
- Flayhan, A., Bergé, C., Bailo, N., Doublet, P., Bayliss, R., and Terradot, L. (2015) The structure of *Legionella pneumophila* LegK4 type four secretion system (T4SS) effector reveals a novel dimeric eukaryotic-like kinase. *Sci Rep* **5**: 14602.
- Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Deeg, M., Bartmann, P., and Neumeister, B. (2000a) Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J Bacteriol* **182**: 1321–1327.
- Flieger, A., Gong, S., Faigle, M., Deeg, M., Bartmann, P., and Neumeister, B. (2000b) Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J Bacteriol* **182**: 1321–1327.
- Flieger, A., Neumeister, B., and Cianciotto, N.P. (2002) Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infect Immun* **70**: 6094–6106.
- Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M., and Heuner, K. (2004) Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infect Immun* **72**: 2648–2658.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., *et al.* (2013) STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* **41**: D808–815.
- Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C.A., and Pugsley, A.P. (2007) Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system. *J Bacteriol* **189**: 1783–1793.
- Franco, I.S., Shohdy, N., and Shuman, H.A. (2012) The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathog* **8**: e1002546.

- Franco, I.S., Shuman, H.A., and Charpentier, X. (2009) The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol* **11**: 1435–1443.
- Fraser, D.W. (1980) Legionellosis: evidence of airborne transmission. *Ann N Y Acad Sci* **353**: 61–66.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., et al. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**: 1189–1197.
- Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P., and Gilbert, C. (2015) Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *J Bacteriol* **197**: 563–571.
- Fullner, K.J., and Mekalanos, J.J. (1999) Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **67**: 1393–1404.
- Gabay, J.E., Blake, M., Niles, W.D., and Horwitz, M.A. (1985) Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol* **162**: 85–91.
- Galka, F., Wai, S.N., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., Schmeck, B., et al. (2008) Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect Immun* **76**: 1825–1836.
- Gao, L.Y., and Abu Kwaik, Y. (1999) Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun* **67**: 4886–4894.
- Gao, L.Y., Stone, B.J., Brieland, J.K., and Abu Kwaik, Y. (1998) Different fates of *Legionella pneumophila* *pmi* and *mil* mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb Pathog* **25**: 291–306.
- Garcia, A., Goñi, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M.T., Calvo-Beguería, L., Rubio, E., et al. (2013) Identification of free-living amoebae and amoeba-associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environ Sci Technol* **47**: 3132–3140.
- Garduño, R.A., Garduño, E., and Hoffman, P.S. (1998) Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* **66**: 4602–4610.
- Gaspar, A.H., and Machner, M.P. (2014) VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 4560–4565.
- Ge, J., Gong, Y.-N., Xu, Y., and Shao, F. (2012) Preventing bacterial DNA release and absent in melanoma 2 inflammasome activation by a *Legionella* effector functioning in membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 6193–6198.
- Ge, J., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, S., et al. (2009) A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the I-kappaB family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 13725–13730.
- Gibson, F.C., Tzianabos, A.O., and Rodgers, F.G. (1994) Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism. *Can J Microbiol* **40**: 865–872.
- Gil, H., Benach, J.L., and Thanassi, D.G. (2004) Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect Immun* **72**: 3042–3047.
- Giltner, C.L., Habash, M., and Burrows, L.L. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins are incorporated into type IV pili. *J Mol Biol* **398**: 444–461.
- Giltner, C.L., Nguyen, Y., and Burrows, L.L. (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **76**: 740–772.

- Giltner, C.L., Schaik, E.J. van, Audette, G.F., Kao, D., Hodges, R.S., Hassett, D.J., and Irvin, R.T. (2006) The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol* **59**: 1083–1096.
- Girón, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710–713.
- Glavin, F.L., Winn, W.C., and Craighead, J.E. (1979) Ultrastructure of lung in Legionnaires' disease. Observations of three biopsies done during the Vermont epidemic. *Ann Intern Med* **90**: 555–559.
- Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., and Kassanoff, I. (1978) Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* **107**: 149–160.
- Gómez, M.I., and Prince, A. (2007) Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas infections* in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* **7**: 244–251.
- Goody, P.R., Heller, K., Oesterlin, L.K., Müller, M.P., Itzen, A., and Goody, R.S. (2012) Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins. *EMBO J* **31**: 1774–1784.
- Green, S.A., Zimmer, K.P., Griffiths, G., and Mellman, I. (1987) Kinetics of intracellular transport and sorting of lysosomal membrane and plasma membrane proteins. *J Cell Biol* **105**: 1227–1240.
- Greig, J.E., Carnie, J.A., Tallis, G.F., Ryan, N.J., Tan, A.G., Gordon, I.R., *et al.* (2004) An outbreak of Legionnaires' disease at the Melbourne Aquarium, April 2000: investigation and case-control studies. *Med J Aust* **180**: 566–572.
- Guragain, M., Lenaburg, D.L., Moore, F.S., Reutlinger, I., and Patrauchan, M.A. (2013) Calcium homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa* requires multiple transporters and modulates swarming motility. *Cell Calcium* **54**: 350–361.
- Haas, R., and Meyer, T.F. (1986) The repertoire of silent pilus genes in *Neisseria gonorrhoeae*: evidence for gene conversion. *Cell* **44**: 107–115.
- Hägele, S., Köhler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., and Steinert, M. (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* **2**: 165–171.
- Hahn, H.P. (1997) The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **192**: 99–108.
- Hambleton, P., Baskerville, A., Fitzgeorge, R.B., and Bailey, N.E. (1982) Pathological and biochemical features of *Legionella pneumophila* infection in guinea-pigs. *J Med Microbiol* **15**: 317–326.
- Han, J., Song, Y., Liu, Z., and Hu, Y. (2011) Culturable bacterial community analysis in the root domains of two varieties of tree peony (*Paeonia ostii*). *FEMS Microbiol Lett* **322**: 15–24.
- Harada, T., Tanikawa, T., Iwasaki, Y., Yamada, M., Imai, Y., and Miyake, M. (2012) Phagocytic entry of *Legionella pneumophila* into macrophages through phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-independent pathway. *Biol Pharm Bull* **35**: 1460–1468.
- Harb, O.S., Gao, L.Y., and Abu Kwaik, Y. (2000) From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* **2**: 251–265.
- Hazes, B., Sastry, P.A., Hayakawa, K., Read, R.J., and Irvin, R.T. (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. *J Mol Biol* **299**: 1005–1017.

- Heiniger, R.W., Winther-Larsen, H.C., Pickles, R.J., Koomey, M., and Wolfgang, M.C. (2010) Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell Microbiol* **12**: 1158–1173.
- Hélaine, S., Carbonnelle, E., Prouvensier, L., Beretti, J.-L., Nassif, X., and Pelicic, V. (2005) PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol* **55**: 65–77.
- Helaine, S., Dyer, D.H., Nassif, X., Pelicic, V., and Forest, K.T. (2007) 3D structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15888–15893.
- Helbig, J.H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., et al. (2002) Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **21**: 710–716.
- Helbig, J.H., Lück, P.C., Knirel, Y.A., Witzleb, W., and Z  hringer, U. (1995) Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol Infect* **115**: 71–78.
- Helbig, J.H., Lück, P.C., Steinert, M., Jacobs, E., and Witt, M. (2001) Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* **32**: 83–88.
- Helbig, J.H., Ludwig, B., Lück, P.C., Groh, A., Witzleb, W., and Hacker, J. (1995) Monoclonal antibodies to *Legionella* Mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**: 160–165.
- Hervet, E., Charpentier, X., Vianney, A., Lazzaroni, J.-C., Gilbert, C., Atlan, D., and Doublet, P. (2011) Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **79**: 1936–1950.
- Heuner, K., Bender-Beck, L., Brand, B.C., Lück, P.C., Mann, K.H., Marre, R., et al. (1995) Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect Immun* **63**: 2499–2507.
- Heuner, K., Dietrich, C., Skriwan, C., Steinert, M., and Hacker, J. (2002) Influence of the alternative sigma(28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **70**: 1604–1608.
- Hilbi, H., Hoffmann, C., and Harrison, C.F. (2011) *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environ Microbiol Rep* **3**: 286–296.
- Hilbi, H., Rothmeier, E., Hoffmann, C., and Harrison, C.F. (2014) Beyond Rab GTPases *Legionella* activates the small GTPase Ran to promote microtubule polymerization, pathogen vacuole motility, and infection. *Small GTPases* **5**: 1–6.
- Hilbi, H., Segal, G., and Shuman, H.A. (2001) Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **42**: 603–617.
- Hoffmann, C., Finsel, I., Otto, A., Pfaffinger, G., Rothmeier, E., Hecker, M., et al. (2014) Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified *Legionella*-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol* **16**: 1034–1052.
- Hopkins, D.L. (1989) *Xylella fastidiosa*: Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. *Annu Rev Phytopathol* **27**: 271–290.
- Hoppe, Julia (2011) Untersuchung von *Legionella pneumophila* PilY1-Mutanten; Masterarbeit.

- Horenkamp, F.A., Mukherjee, S., Alix, E., Schauder, C.M., Hubber, A.M., Roy, C.R., and Reinisch, K.M. (2014) *Legionella pneumophila* subversion of host vesicular transport by SidC effector proteins. *Traffic Cph Den* **15**: 488–499.
- Horwitz, M.A. (1983a) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 1319–1331.
- Horwitz, M.A. (1983b) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 1319–1331.
- Horwitz, M.A. (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**: 27–33.
- Horwitz, M.A., and Silverstein, S.C. (1980) Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* **66**: 441–450.
- Houston, S., Russell, S., Hof, R., Roberts, A.K., Cullen, P., Irvine, K., et al. (2014) The multifunctional role of the pallilysin-associated *Treponema pallidum* protein, Tp0750, in promoting fibrinolysis and extracellular matrix component degradation. *Mol Microbiol* **91**: 618–634.
- Hovel-Miner, G., Pampou, S., Faucher, S.P., Clarke, M., Morozova, I., Morozov, P., et al. (2009) SigmaS controls multiple pathways associated with intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **191**: 2461–2473.
- Howell-Adams, B., and Seifert, H.S. (1999) Insertion mutations in *pilE* differentially alter gonococcal pilin antigenic variation. *J Bacteriol* **181**: 6133–6141.
- Hsu, F., Luo, X., Qiu, J., Teng, Y.-B., Jin, J., Smolka, M.B., et al. (2014) The *Legionella* effector SidC defines a unique family of ubiquitin ligases important for bacterial phagosomal remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 10538–10543.
- Hsu, F., Zhu, W., Brennan, L., Tao, L., Luo, Z.-Q., and Mao, Y. (2012) Structural basis for substrate recognition by a unique *Legionella* phosphoinositide phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 13567–13572.
- Hubber, A., Kubori, T., and Nagai, H. (2013) Modulation of the ubiquitination machinery by *Legionella*. *Curr Top Microbiol Immunol* **376**: 227–247.
- Hubber, A., and Roy, C.R. (2010) Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 261–283.
- Husmann, L.K., and Johnson, W. (1992) Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. *Infect Immun* **60**: 5212–5218.
- Iacono, K.T., Brown, A.L., Greene, M.I., and Saouaf, S.J. (2007) CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* **83**: 283–295.
- Imam, S., Chen, Z., Roos, D.S., and Pohlschröder, M. (2011) Identification of surprisingly diverse type IV pili, across a broad range of gram-positive bacteria. *PloS One* **6**: e28919.
- Inclan, Y.F., Persat, A., Greninger, A., Von Dollen, J., Johnson, J., Krogan, N., et al. (2016) A scaffold protein connects type IV pili with the Chp chemosensory system to mediate activation of virulence signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* .
- Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D.G., and Roy, C.R. (2007) *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**: 365–369.
- Isaac, D.T., and Isberg, R. (2014) Master manipulators: an update on *Legionella pneumophila* Icm/Dot translocated substrates and their host targets. *Future Microbiol* **9**: 343–359.

- Isberg, R.R., O'Connor, T.J., and Heidtman, M. (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**: 13–24.
- Ivanov, S.S., and Roy, C.R. (2009) Modulation of ubiquitin dynamics and suppression of DALIS formation by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Cell Microbiol* **11**: 261–278.
- Iwamoto, D.V., and Calderwood, D.A. (2015) Regulation of integrin-mediated adhesions. *Curr Opin Cell Biol* **36**: 41–47.
- Jacobi, S., and Heuner, K. (2003) Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol IJMM* **293**: 349–358.
- Jäger, J., Keese, S., Roessle, M., Steinert, M., and Schromm, A.B. (2015) Fusion of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes. *Cell Microbiol* **17**: 607–620.
- Jäger, J., Marwitz, S., Tiefenau, J., Rasch, J., Shevchuk, O., Kugler, C., et al. (2014) Human lung tissue explants reveal novel interactions during *Legionella pneumophila* infections. *Infect Immun* **82**: 275–285.
- Jepras, R.I., Fitzgeorge, R.B., and Baskerville, A. (1985) A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)* **95**: 29–38.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C.J., Braun, D., Baaske, P., and Duhr, S. (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* **9**: 342–353.
- Johannes, L., and Lamaze, C. (2002) Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic Cph Den* **3**: 443–451.
- Johansson, L., Rytönen, A., Bergman, P., Albiger, B., Källström, H., Hökfelt, T., et al. (2003) CD46 in meningococcal disease. *Science* **301**: 373–375.
- Johnson, M.D.L., Garrett, C.K., Bond, J.E., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., and Redinbo, M.R. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* PilY1 binds integrin in an RGD- and calcium-dependent manner. *PloS One* **6**: e29629.
- Joseph, C.A., Ricketts, K.D., and European Working Group for *Legionella* Infections (2010) Legionnaires disease in Europe 2007-2008. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* **15**: 19493.
- Joseph, C., Ricketts, K., (2008) The epidemiology of Legionnaires' disease. In: Heuner, K., Swanson, M. (Eds.), *Legionella: Molecular Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 35–54.
- Julia Hoppe (2011) Untersuchung von *Legionella pneumophila* PilY1-Mutanten; Materarbeit. .
- Jung, A.L., Stoiber, C., Herkt, C.E., Schulz, C., Bertrams, W., and Schmeck, B. (2016) *Legionella pneumophila*-Derived Outer Membrane Vesicles Promote Bacterial Replication in Macrophages. *PLoS Pathog* **12**: e1005592.
- Kachlany, S.C., Planet, P.J., Bhattacharjee, M.K., Kolia, E., DeSalle, R., Fine, D.H., and Figurski, D.H. (2000) Nonspecific Adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Requires Genes Widespread in Bacteria and Archaea. *J Bacteriol* **182**: 6169–6176.
- Kagan, J.C., and Roy, C.R. (2002) *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**: 945–954.
- Kagan, J.C., Stein, M.-P., Pypaert, M., and Roy, C.R. (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J Exp Med* **199**: 1201–1211.

- Källström, H., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Jonsson, A.B. (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**: 639–647.
- Karlyshev, A.V., Pallen, M.J., and Wren, B.W. (2000) Single-primer PCR procedure for rapid identification of transposon insertion sites. *BioTechniques* **28**: 1078, 1080, 1082.
- Karuppiiah, V., Collins, R.F., Thistlethwaite, A., Gao, Y., and Derrick, J.P. (2013) Structure and assembly of an inner membrane platform for initiation of type IV pilus biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E4638–4647.
- Katz, S.M., Hashemi, S., Brown, K.R., Habib, W.A., and Hammel, J.M. (1984) Pleomorphism of *Legionella pneumophila*. *Ultrastruct Pathol* **6**: 117–129.
- Kearns, D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**: 634–644.
- Keen, M.G., and Hoffman, P.S. (1989) Characterization of a *Legionella pneumophila* extracellular protease exhibiting hemolytic and cytotoxic activities. *Infect Immun* **57**: 732–738.
- Kehl-Fie, T.E., Miller, S.E., and St Geme, J.W. (2008) *Kingella kingae* expresses type IV pili that mediate adherence to respiratory epithelial and synovial cells. *J Bacteriol* **190**: 7157–7163.
- King, N.P., Newton, P., Schuelein, R., Brown, D.L., Petru, M., Zarsky, V., et al. (2015) Soluble NSF attachment protein receptor molecular mimicry by a *Legionella pneumophila* Dot/Icm effector. *Cell Microbiol* **17**: 767–784.
- Kirchner, M., Heuer, D., and Meyer, T.F. (2005) CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 3072–3082.
- Kirn, T.J., Lafferty, M.J., Sandoe, C.M., and Taylor, R.K. (2000) Delineation of pilin domains required for bacterial association into microcolonies and intestinal colonization by *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **35**: 896–910.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**: 1511–1524.
- Koga, T., Ishimoto, K., and Lory, S. (1993) Genetic and functional characterization of the gene cluster specifying expression of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *Infect Immun* **61**: 1371–1377.
- Konto-Ghiorgi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., and Dramsi, S. (2009) Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog* **5**: e1000422.
- Koo, J., Tammam, S., Ku, S.-Y., Sampaleanu, L.M., Burrows, L.L., and Howell, P.L. (2008) PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin. *J Bacteriol* **190**: 6961–6969.
- Koo, J., Tang, T., Harvey, H., Tammam, S., Sampaleanu, L., Burrows, L.L., and Howell, P.L. (2013) Functional mapping of PilF and PilQ in the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system. *Biochemistry (Mosc)* **52**: 2914–2923.
- Korotkov, K.V., Gray, M.D., Kreger, A., Turley, S., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2009) Calcium is essential for the major pseudopilin in the type 2 secretion system. *J Biol Chem* **284**: 25466–25470.
- Koubar, M., Rodier, M.-H., and Frère, J. (2013) Involvement of minerals in adherence of *Legionella pneumophila* to surfaces. *Curr Microbiol* **66**: 437–442.
- Krinos, C., High, A.S., and Rodgers, F.G. (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J Appl Microbiol* **86**: 237–244.

- Krishnan, V., Dwivedi, P., Kim, B.J., Samal, A., Macon, K., Ma, X., *et al.* (2013) Structure of *Streptococcus agalactiae* tip pilin GBS104: a model for GBS pili assembly and host interactions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**: 1073–1089.
- Ku, B., Lee, K.-H., Park, W.S., Yang, C.-S., Ge, J., Lee, S.-G., *et al.* (2012) VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages. *PLoS Pathog* **8**: e1003082.
- Kubori, T., Hyakutake, A., and Nagai, H. (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol Microbiol* **67**: 1307–1319.
- Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H., and Nagai, H. (2010) *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector. *PLoS Pathog* **6**: e1001216.
- Kuchma, S.L., Ballok, A.E., Merritt, J.H., Hammond, J.H., Lu, W., Rabinowitz, J.D., and O'Toole, G.A. (2010) Cyclic-di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa*: the *pilY1* gene and its impact on surface-associated behaviors. *J Bacteriol* **192**: 2950–2964.
- Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M., and O'Toole, G.A. (2007) BifA, a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**: 8165–8178.
- Kuchma, S.L., Griffin, E.F., and O'Toole, G.A. (2012) Minor pilins of the type IV pilus system participate in the negative regulation of swarming motility. *J Bacteriol* **194**: 5388–5403.
- Kuhle, K., Krausze, J., Curth, U., Rössle, M., Heuner, K., Lang, C., and Flieger, A. (2014) Oligomerization inhibits *Legionella pneumophila* PlaB phospholipase A activity. *J Biol Chem* **289**: 18657–18666.
- Laguna, R.K., Creasey, E.A., Li, Z., Valtz, N., and Isberg, R.R. (2006) A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18745–18750.
- Lally, E.T., Kieba, I.R., Sato, A., Green, C.L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., *et al.* (1997) RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem* **272**: 30463–30469.
- Lammertyn, E., and Anné, J. (2004) Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS Microbiol Lett* **238**: 273–279.
- Lammertyn, E., Van Mellaert, L., Meyen, E., Lebeau, I., De Buck, E., Anné, J., and Geukens, N. (2004) Molecular and functional characterization of type I signal peptidase from *Legionella pneumophila*. *Microbiol Read Engl* **150**: 1475–1483.
- Lang, C., and Flieger, A. (2011) Characterisation of *Legionella pneumophila* phospholipases and their impact on host cells. *Eur J Cell Biol* **90**: 903–912.
- Lang, C., Rastew, E., Hermes, B., Siegbrecht, E., Ahrends, R., Banerji, S., and Flieger, A. (2012) Zinc metalloproteinase ProA directly activates *Legionella pneumophila* PlaC glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase. *J Biol Chem* **287**: 23464–23478.
- Lau, R., Maqsood, S., Harte, D., Caughley, B., and Deacon, R. (2013) Prevalence of *Legionella* strains in cooling towers and legionellosis cases in New Zealand. *J Environ Health* **75**: 82–89.
- Lauer, P., Albertson, N.H., and Koomey, M. (1993) Conservation of genes encoding components of a type IV pilus assembly/two-step protein export pathway in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **8**: 357–368.
- Lecuyer, S., Rusconi, R., Shen, Y., Forsyth, A., Vlamakis, H., Kolter, R., and Stone, H.A. (2011) Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J* **100**: 341–350.

- Lee, K.K., Sheth, H.B., Wong, W.Y., Sherburne, R., Paranchych, W., Hodges, R.S., *et al.* (1994) The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol Microbiol* **11**: 705–713.
- Leighton, T.L., Buensuceso, R.N.C., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2015) Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environ Microbiol* **17**: 4148–4163.
- Leighton, T.L., Dayalani, N., Sampaleanu, L.M., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2015) Novel Role for PilNO in Type IV Pilus Retraction Revealed by Alignment Subcomplex Mutations. *J Bacteriol* **197**: 2229–2238.
- Lele, P.P., Hosu, B.G., and Berg, H.C. (2013) Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11839–11844.
- Lemkul, J.A., and Bevan, D.R. (2011) Characterization of interactions between PilA from *Pseudomonas aeruginosa* strain K and a model membrane. *J Phys Chem B* **115**: 8004–8008.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015) SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* **43**: D257–260.
- Lewenza, S., Gardy, J.L., Brinkman, F.S.L., and Hancock, R.E.W. (2005) Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* exported proteins using a consensus computational strategy combined with a laboratory-based PhoA fusion screen. *Genome Res* **15**: 321–329.
- Li, J., Lim, M.S., Li, S., Brock, M., Pique, M.E., Woods, V.L., and Craig, L. (2008) *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Struct Lond Engl* **16**: 137–148.
- Li, T., Lu, Q., Wang, G., Xu, H., Huang, H., Cai, T., *et al.* (2013) SET-domain bacterial effectors target heterochromatin protein 1 to activate host rDNA transcription. *EMBO Rep* **14**: 733–740.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., *et al.* (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* **43**: W580–584.
- Liles, M.R., Edelstein, P.H., and Cianciotto, N.P. (1999) The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **31**: 959–970.
- Liles, M.R., Scheel, T.A., and Cianciotto, N.P. (2000) Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **182**: 749–757.
- Liles, M.R., Viswanathan, V.K., and Cianciotto, N.P. (1998) Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect Immun* **66**: 1776–1782.
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., *et al.* (2015) IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinforma Oxf Engl*.
- Losick, V.P., Haenssler, E., Moy, M.-Y., and Isberg, R.R. (2010) LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF-kappaB. *Cell Microbiol* **12**: 1083–1097.
- Lu, H., and Clarke, M. (2005) Dynamic properties of *Legionella*-containing phagosomes in *Dictyostelium amoebae*. *Cell Microbiol* **7**: 995–1007.
- Lucas, C.E., Brown, E., and Fields, B.S. (2006) Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiol Read Engl* **152**: 3569–3573.

- Lucas, M., Gaspar, A.H., Pallara, C., Rojas, A.L., Fernández-Recio, J., Machner, M.P., and Hierro, A. (2014) Structural basis for the recruitment and activation of the *Legionella* phospholipase VipD by the host GTPase Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E3514–3523.
- Luo, Y., Zhao, K., Baker, A.E., Kuchma, S.L., Coggan, K.A., Wolfgang, M.C., *et al.* (2015) A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors. *mBio* **6**.
- Luo, Z.-Q., and Isberg, R.R. (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 841–846.
- Ma, A.T., McAuley, S., Pukatzki, S., and Mekalanos, J.J. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe* **5**: 234–243.
- Macdonald, D.L., Pasloske, B.L., and Paranchych, W. (1993) Mutations in the fifth-position glutamate in *Pseudomonas aeruginosa* pilin affect the transmethylation of the N-terminal phenylalanine. *Can J Microbiol* **39**: 500–505.
- Machner, M.P., and Isberg, R.R. (2006) Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell* **11**: 47–56.
- Maier, B., Potter, L., So, M., Long, C.D., Seifert, H.S., and Sheetz, M.P. (2002) Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16012–16017.
- Maimaiti, J., Zhang, Y., Yang, J., Cen, Y.-P., Layzell, D.B., Peoples, M., and Dong, Z. (2007) Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth. *Environ Microbiol* **9**: 435–444.
- Mairey, E., Genovesio, A., Donnadieu, E., Bernard, C., Jaubert, F., Pinard, E., *et al.* (2006) Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp Med* **203**: 1939–1950.
- Mallegol, J., Duncan, C., Prashar, A., So, J., Low, D.E., Terebeznik, M., and Guyard, C. (2012) Essential roles and regulation of the *Legionella pneumophila* collagen-like adhesin during biofilm formation. *PloS One* **7**: e46462.
- Mao, Y., Yu, L., Yang, R., Qu, L., and Harrington, P. de B. (2015) A novel method for the study of molecular interaction by using microscale thermophoresis. *Talanta* **132**: 894–901.
- Marceau, M., Beretti, J.L., and Nassif, X. (1995) High adhesiveness of encapsulated *Neisseria meningitidis* to epithelial cells is associated with the formation of bundles of pili. *Mol Microbiol* **17**: 855–863.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., *et al.* (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37**: D205–210.
- Marra, A., Blander, S.J., Horwitz, M.A., and Shuman, H.A. (1992) Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9607–9611.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289–314.
- Mattick, J.S., Whitchurch, C.B., and Alm, R.A. (1996) The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* **179**: 147–155.
- McCallum, M., Tammam, S., Little, D.J., Robinson, H., Koo, J., Shah, M., *et al.* (2016) PilN binding modulates the structure and binding partners of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IVa Pilus protein PilM. *J Biol Chem* .

- McCoy-Simandle, K., Stewart, C.R., Dao, J., DebRoy, S., Rossier, O., Bryce, P.J., and Cianciotto, N.P. (2011) *Legionella pneumophila* type II secretion dampens the cytokine response of infected macrophages and epithelia. *Infect Immun* **79**: 1984–1997.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., and Dowdle, W.R. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**: 1197–1203.
- Meng, Y., Li, Y., Galvani, C.D., Hao, G., Turner, J.N., Burr, T.J., and Hoch, H.C. (2005) Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *J Bacteriol* **187**: 5560–5567.
- Merz, A.J., Enns, C.A., and So, M. (1999) Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* **32**: 1316–1332.
- Merz, A.J., and So, M. (2000) Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 423–457.
- Merz, A.J., So, M., and Sheetz, M.P. (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**: 98–102.
- Michard, C., Sperandio, D., Baïlo, N., Pizarro-Cerdá, J., LeClaire, L., Chadeau-Argaud, E., *et al.* (2015) The *Legionella* Kinase LegK2 Targets the ARP2/3 Complex To Inhibit Actin Nucleation on Phagosomes and Allow Bacterial Evasion of the Late Endocytic Pathway. *mBio* **6**: e00354-315.
- Mikaty, G., Soyer, M., Mairey, E., Henry, N., Dyer, D., Forest, K.T., *et al.* (2009) Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog* **5**: e1000314.
- Miller, F., Phan, G., Brissac, T., Bouchiat, C., Lioux, G., Nassif, X., and Coureuil, M. (2014) The hypervariable region of meningococcal major pilin PilE controls the host cell response via antigenic variation. *mBio* **5**: e01024-1013.
- Mintz, C.S., Schultz, D.R., Arnold, P.I., and Johnson, W. (1992) *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect Immun* **60**: 2769–2776.
- Misic, A.M., Satyshur, K.A., and Forest, K.T. (2010) *P. aeruginosa* PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor. *J Mol Biol* **400**: 1011–1021.
- Mody, C.H., Paine, R., Shahrabadi, M.S., Simon, R.H., Pearlman, E., Eisenstein, B.I., and Toews, G.B. (1993) *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J Infect Dis* **167**: 1138–1145.
- Moffat, J.F., Edelstein, P.H., Regula, D.P., Cirillo, J.D., and Tompkins, L.S. (1994) Effects of an isogenic Zn-metalloprotease-deficient mutant of *Legionella pneumophila* in a guinea-pig pneumonia model. *Mol Microbiol* **12**: 693–705.
- Molmeret, M., and Abu Kwaik, Y. (2002) How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? *Trends Microbiol* **10**: 258–260.
- Molmeret, M., Alli, O.A.T., Radulic, M., Susa, M., Doric, M., and Kwaik, Y.A. (2002) The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Mol Microbiol* **43**: 1139–1150.
- Molmeret, M., Alli, O.A.T., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N.P., and Kwaik, Y.A. (2002) icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **70**: 69–78.
- Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L., and Kwaik, Y.A. (2004) Disruption of the phagosomal membrane and egress of *Legionella pneumophila* into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun* **72**: 4040–4051.

- Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Abu Kwaik, Y. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**: 20–28.
- Molmeret, M., Jones, S., Santic, M., Habyarimana, F., Esteban, M.T.G., and Kwaik, Y.A. (2010) Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol. *Environ Microbiol* **12**: 704–715.
- Molofsky, A.B., and Swanson, M.S. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* **53**: 29–40.
- Morand, P.C., Bille, E., Morelle, S., Eugène, E., Beretti, J.-L., Wolfgang, M., *et al.* (2004) Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. *EMBO J* **23**: 2009–2017.
- Morand, P.C., Tattévin, P., Eugene, E., Beretti, J.L., and Nassif, X. (2001) The adhesive property of the type IV pilus-associated component PilC1 of pathogenic *Neisseria* is supported by the conformational structure of the N-terminal part of the molecule. *Mol Microbiol* **40**: 846–856.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J., and Sebo, P. (2008) RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5355–5360.
- Müller, A., Hacker, J., and Brand, B.C. (1996) Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. *Infect Immun* **64**: 4900–4906.
- Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D.K., Lambright, D.G., and Roy, C.R. (2006) The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* **8**: 971–977.
- Murray, T.S., and Kazmierczak, B.I. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J Bacteriol* **190**: 2700–2708.
- Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A., and Roy, C.R. (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**: 679–682.
- Nakano, N., Kubori, T., Kinoshita, M., Imada, K., and Nagai, H. (2010) Crystal structure of *Legionella* DotD: insights into the relationship between type IVB and type II/III secretion systems. *PLoS Pathog* **6**: e1001129.
- Nassif, X. (1999) Interaction mechanisms of encapsulated meningococci with eucaryotic cells: what does this tell us about the crossing of the blood-brain barrier by *Neisseria meningitidis*? *Curr Opin Microbiol* **2**: 71–77.
- Neuhaus, E.M., Horstmann, H., Almers, W., Maniak, M., and Soldati, T. (1998) Ethane-freezing/methanol-fixation of cell monolayers: a procedure for improved preservation of structure and antigenicity for light and electron microscopies. *J Struct Biol* **121**: 326–342.
- Neumeister, B., Faigle, M., Sommer, M., Zähringer, U., Stelter, F., Menzel, R., *et al.* (1998) Low endotoxic potential of *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide due to failure of interaction with the monocyte lipopolysaccharide receptor CD14. *Infect Immun* **66**: 4151–4157.
- Nevo, O., Zusman, T., Rasis, M., Lifshitz, Z., and Segal, G. (2014) Identification of *Legionella pneumophila* effectors regulated by the LetAS-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, many of which modulate vesicular trafficking. *J Bacteriol* **196**: 681–692.
- Newton, H.J., Ang, D.K.Y., Driel, I.R. van, and Hartland, E.L. (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* **23**: 274–298.
- Newton, H.J., Sansom, F.M., Dao, J., Cazalet, C., Bruggemann, H., Albert-Weissenberger, C., *et al.* (2008) Significant role for *ladC* in initiation of *Legionella pneumophila* infection. *Infect Immun* **76**: 3075–3085.

- Nguyen, Y., Sugiman-Marangos, S., Harvey, H., Bell, S.D., Charlton, C.L., Junop, M.S., and Burrows, L.L. (2015) *Pseudomonas aeruginosa* minor pilins prime type IVa pilus assembly and promote surface display of the PilY1 adhesin. *J Biol Chem* **290**: 601–611.
- Nikaido, H. (1994) Isolation of outer membranes. *Methods Enzymol* **235**: 225–234.
- Ninio, S., Zuckman-Cholon, D.M., Cambronne, E.D., and Roy, C.R. (2005) The *Legionella* IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Mol Microbiol* **55**: 912–926.
- Nishikawa, S., Shinzawa, N., Nakamura, K., Ishigaki, K., Abe, H., and Horiguchi, Y. (2016) The bvg-repressed gene *brtA*, encoding biofilm-associated surface adhesin, is expressed during host infection by *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Immunol* **60**: 93–105.
- Nölling, J., Breton, G., Omelchenko, M.V., Makarova, K.S., Zeng, Q., Gibson, R., *et al.* (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**: 4823–4838.
- Nunn, D.N., and Lory, S. (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene *pilD* is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3281–3285.
- O'Connor, T.J., Adepoju, Y., Boyd, D., and Isberg, R.R. (2011) Minimization of the *Legionella pneumophila* genome reveals chromosomal regions involved in host range expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 14733–14740.
- O'Connor, T.J., Boyd, D., Dorer, M.S., and Isberg, R.R. (2012) Aggravating genetic interactions allow a solution to redundancy in a bacterial pathogen. *Science* **338**: 1440–1444.
- Orans, J., Johnson, M.D.L., Coggan, K.A., Sperlazza, J.R., Heiniger, R.W., Wolfgang, M.C., and Redinbo, M.R. (2010) Crystal structure analysis reveals *Pseudomonas* PilY1 as an essential calcium-dependent regulator of bacterial surface motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 1065–1070.
- Palusińska-Szys, M., and Russa, R. (2009) Chemical structure and biological significance of lipopolysaccharide from *Legionella*. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc* **4**: 96–107.
- Paranchych, W., Sastry, P.A., Frost, L.S., Carpenter, M., Armstrong, G.D., and Watts, T.H. (1979) Biochemical studies on pili isolated from *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *Can J Microbiol* **25**: 1175–1181.
- Parge, H.E., Forest, K.T., Hickey, M.J., Christensen, D.A., Getzoff, E.D., and Tainer, J.A. (1995) Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**: 32–38.
- Parker, J.K., Cruz, L.F., Evans, M.R., and De La Fuente, L. (2015) Presence of calcium-binding motifs in PilY1 homologs correlates with Ca-mediated twitching motility and evolutionary history across diverse bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **362**.
- Pasloske, B.L., Scraba, D.G., and Paranchych, W. (1989) Assembly of mutant pilins in *Pseudomonas aeruginosa*: formation of pili composed of heterologous subunits. *J Bacteriol* **171**: 2142–2147.
- Payne, N.R., and Horwitz, M.A. (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* **166**: 1377–1389.
- Peabody, C.R., Chung, Y.J., Yen, M.-R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A.P., and Saier, M.H. (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiol Read Engl* **149**: 3051–3072.
- Pearson, J.S., Zhang, Y., Newton, H.J., and Hartland, E.L. (2015) Post-modern pathogens: surprising activities of translocated effectors from *E. coli* and *Legionella*. *Curr Opin Microbiol* **23**: 73–79.

- Pehl, M.J., Jamieson, W.D., Kong, K., Forbester, J.L., Fredendall, R.J., Gregory, G.A., *et al.* (2012) Genes that influence swarming motility and biofilm formation in *Variovorax paradoxus* EPS. *PLoS One* **7**: e31832.
- Pellicic, V. (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**: 827–837.
- Peracino, B., Balest, A., and Bozzaro, S. (2010) Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nrp1-induced resistance to *Legionella* infection in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* **123**: 4039–4051.
- Persat, A., Inclan, Y.F., Engel, J.N., Stone, H.A., and Gitai, Z. (2015) Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 7563–7568.
- Petermann, N., Hansen, G., Schmidt, C.L., and Hilgenfeld, R. (2010) Structure of the GTPase and GDI domains of FeoB, the ferrous iron transporter of *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett* **584**: 733–738.
- Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H.R., Zhang, N., Kumar, K., *et al.* (2014) Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis* **14**: 1011–1021.
- Pilewski, J.M., Latoche, J.D., Arcasoy, S.M., and Albelda, S.M. (1997) Expression of integrin cell adhesion receptors during human airway epithelial repair in vivo. *Am J Physiol* **273**: L256–263.
- Planet, P.J., Kachlany, S.C., DeSalle, R., and Figurski, D.H. (2001) Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2503–2508.
- Pohlschroder, M., Ghosh, A., Tripepi, M., and Albers, S.-V. (2011) Archaeal type IV pilus-like structures--evolutionarily conserved prokaryotic surface organelles. *Curr Opin Microbiol* **14**: 357–363.
- Pope, C.D., Dhand, L., and Cianciotto, N.P. (1994) Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* with mini-Tn10. *FEMS Microbiol Lett* **124**: 107–111.
- Porsch, E.A., Johnson, M.D.L., Broadnax, A.D., Garrett, C.K., Redinbo, M.R., and St Geme, J.W. (2013) Calcium binding properties of the *Kingella kingae* PilC1 and PilC2 proteins have differential effects on type IV pilus-mediated adherence and twitching motility. *J Bacteriol* **195**: 886–895.
- Portier, E., Zheng, H., Sahr, T., Burnside, D.M., Mallama, C., Buchrieser, C., *et al.* (2015) IroT/mavN, a new iron-regulated gene involved in *Legionella pneumophila* virulence against amoebae and macrophages. *Environ Microbiol* **17**: 1338–1350.
- Potts, A., Donaghy, M., Marley, M., Othieno, R., Stevenson, J., Hyland, J., *et al.* (2013) Cluster of Legionnaires disease cases caused by *Legionella longbeachae* serogroup 1, Scotland, August to September 2013. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* **18**: 20656.
- Price, C.T., Al-Khodori, S., Al-Quadani, T., Santic, M., Habyarimana, F., Kalia, A., and Kwaik, Y.A. (2009) Molecular mimicry by an F-box effector of *Legionella pneumophila* hijacks a conserved polyubiquitination machinery within macrophages and protozoa. *PLoS Pathog* **5**: e1000704.
- Price, C.T.D., Al-Quadani, T., Santic, M., Jones, S.C., and Abu Kwaik, Y. (2010) Exploitation of conserved eukaryotic host cell farnesylation machinery by an F-box effector of *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* **207**: 1713–1726.
- Price, C.T.D., Al-Quadani, T., Santic, M., Rosenshine, I., and Abu Kwaik, Y. (2011) Host proteasomal degradation generates amino acids essential for intracellular bacterial growth. *Science* **334**: 1553–1557.

- Pujol, C., Eugène, E., Marceau, M., and Nassif, X. (1999) The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4017–4022.
- Qiu, J., Sheedlo, M.J., Yu, K., Tan, Y., Nakayasu, E.S., Das, C., *et al.* (2016) Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature*.
- Quinn, F.D., and Tompkins, L.S. (1989) Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities. *Mol Microbiol* **3**: 797–805.
- Ragaz, C., Pietsch, H., Urwyler, S., Tiaden, A., Weber, S.S., and Hilbi, H. (2008) The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cell Microbiol* **10**: 2416–2433.
- Rahman, M., Källström, H., Normark, S., and Jonsson, A.B. (1997) PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **25**: 11–25.
- Ramboarina, S., Fernandes, P.J., Daniell, S., Islam, S., Simpson, P., Frankel, G., *et al.* (2005) Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**: 40252–40260.
- Rasch, J., Krüger, S., Fontvieille, D., Ünal, C.M., Michel, R., Labrosse, A., and Steinert, M. (2016) *Legionella*-protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. *Int J Med Microbiol IJMM*.
- Rasch, J., Theuerkorn, M., Ünal, C., Heinsohn, N., Tran, S., Fischer, G., *et al.* (2015) Novel Cycloheximide Derivatives Targeting the Moonlighting Protein Mip Exhibit Specific Antimicrobial Activity Against *Legionella pneumophila*. *Front Bioeng Biotechnol* **3**: 41.
- Rasch, J., Ünal, C.M., and Steinert, M. (2014) Peptidylprolyl cis-trans isomerases of *Legionella pneumophila*: virulence, moonlighting and novel therapeutic targets. *Biochem Soc Trans* **42**: 1728–1733.
- Rechnitzer, C., and Blom, J. (1989) Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* **97**: 105–114.
- Rechnitzer, C., Diamant, M., and Pedersen, B.K. (1989) Inhibition of human natural killer cell activity by *Legionella pneumophila* protease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **8**: 989–992.
- Reeves, M.W., Pine, L., Hutner, S.H., George, J.R., and Harrell, W.K. (1981) Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **13**: 688–695.
- Riboldi-Tunnicliffe, A., König, B., Jessen, S., Weiss, M.S., Rahfeld, J., Hacker, J., *et al.* (2001) Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat Struct Biol* **8**: 779–783.
- Ricketts, K., Joseph, C.A., Yadav, R., and European Working Group for *Legionella* Infections (2010) Travel-associated Legionnaires disease in Europe in 2008. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* **15**: 19578.
- Ricketts, K.D., Charlett, A., Gelb, D., Lane, C., Lee, J.V., and Joseph, C.A. (2009) Weather patterns and Legionnaires' disease: a meteorological study. *Epidemiol Infect* **137**: 1003–1012.
- Rigden, D.J., Jedrzejewski, M.J., Moroz, O.V., and Galperin, M.Y. (2003) Structural diversity of calcium-binding proteins in bacteria: single-handed EF-hands? *Trends Microbiol* **11**: 295–297.

Rigden, D.J., Woodhead, D.D., Wong, P.W.H., and Galperin, M.Y. (2011) New structural and functional contexts of the Dx[DN]xDG linear motif: insights into evolution of calcium-binding proteins. *PLoS One* **6**: e21507.

Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin 13/2015. Legionärskrankheit in Deutschland (2001 bis 2013). https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/13_15.pdf?blob=publicationFile; (Berlin März 2015)

Robey, M., and Cianciotto, N.P. (2002) *Legionella pneumophila* feoAB promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect Immun* **70**: 5659–5669.

Robinson, C.G., and Roy, C.R. (2006) Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **8**: 793–805.

Rodgers, F.G., and Gibson, F.C. (1993) Opsonin-independent adherence and intracellular development of *Legionella pneumophila* within U-937 cells. *Can J Microbiol* **39**: 718–722.

Rodgers, F.G., Greaves, P.W., Macrae, A.D., and Lewis, M.J. (1980) Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J Clin Pathol* **33**: 1184–1188.

Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., et al. (2013) *Legionella pneumophila* effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* **13**: 395–405.

Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2001) Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **69**: 2092–2098.

Rossier, O., Starkenburg, S.R., and Cianciotto, N.P. (2004) *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun* **72**: 310–321.

Rothmeier, E., Pfaffinger, G., Hoffmann, C., Harrison, C.F., Grabmayr, H., Repnik, U., et al. (2013) Activation of Ran GTPase by a *Legionella* effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS Pathog* **9**: e1003598.

Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–1183.

Roy, C.R., Berger, K.H., and Isberg, R.R. (1998) *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol* **28**: 663–674.

Rudel, T., Scheurerpflug, I., and Meyer, T.F. (1995) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* **373**: 357–359.

Ruggeri, Z.M., and Ware, J. (1993) von Willebrand factor. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **7**: 308–316.

Rupp, J., Droemann, D., Goldmann, T., Zabel, P., Solbach, W., Vollmer, E., et al. (2004) Alveolar epithelial cells type II are major target cells for *C. pneumoniae* in chronic but not in acute respiratory infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**: 197–203.

Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2009) Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **72**: 741–762.

Sampaleanu, L.M., Bonanno, J.B., Ayers, M., Koo, J., Tammam, S., Burley, S.K., et al. (2009) Periplasmic domains of *Pseudomonas aeruginosa* PilN and PilO form a stable heterodimeric complex. *J Mol Biol* **394**: 143–159.

- Samrakandi, M.M., Ridenour, D.A., Yan, L., and Cirillo, J.D. (2002) Entry into host cells by *Legionella*. *Front Biosci J Virtual Libr* **7**: d1-11.
- Sarkisova, S., Patrauchan, M.A., Berglund, D., Nivens, D.E., and Franklin, M.J. (2005) Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**: 4327–4337.
- Satyshur, K.A., Worzalla, G.A., Meyer, L.S., Heiniger, E.K., Aukema, K.G., Misic, A.M., and Forest, K.T. (2007) Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Struct Lond Engl* **15**: 363–376.
- Schellenberg, J.J., Links, M.G., Hill, J.E., Dumonceaux, T.J., Kimani, J., Jaoko, W., *et al.* (2011) Molecular definition of vaginal microbiota in East African commercial sex workers. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4066–4074.
- Scheuerpflug, I., Rudel, T., Ryll, R., Pandit, J., and Meyer, T.F. (1999) Roles of PilC and PilE proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **67**: 834–843.
- Schroeder, G.N., Petty, N.K., Mousnier, A., Harding, C.R., Vogrin, A.J., Wee, B., *et al.* (2010) *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol* **192**: 6001–6016.
- Schroeder, T.H., Zaidi, T., and Pier, G.B. (2001) Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. *Infect Immun* **69**: 719–729.
- Schunder, E., Adam, P., Higa, F., Remer, K.A., Lorenz, U., Bender, J., *et al.* (2010) Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol IJMM* **300**: 313–323.
- Schunder, E., Gillmaier, N., Kutzner, E., Eisenreich, W., Herrmann, V., Lautner, M., and Heuner, K. (2014) Amino Acid Uptake and Metabolism of *Legionella pneumophila* Hosted by *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* **289**: 21040–21054.
- Seeger, E.M., Thuma, M., Fernandez-Moreira, E., Jacobs, E., Schmitz, M., and Helbig, J.H. (2010) Lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* shed in a liquid culture as a nonvesicular fraction arrests phagosome maturation in amoeba and monocytic host cells. *FEMS Microbiol Lett* **307**: 113–119.
- Segal, G., Purcell, M., and Shuman, H.A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1669–1674.
- Semmler, A.B., Whitchurch, C.B., Leech, A.J., and Mattick, J.S. (2000) Identification of a novel gene, fimV, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Read Engl* **146 (Pt 6)**: 1321–1332.
- Serrano-Suárez, A., Dellundé, J., Salvadó, H., Cervero-Aragó, S., Méndez, J., Canals, O., *et al.* (2013) Microbial and physicochemical parameters associated with *Legionella* contamination in hot water recirculation systems. *Environ Sci Pollut Res Int* **20**: 5534–5544.
- Sexton, J.A., and Vogel, J.P. (2004) Regulation of hypercompetence in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **186**: 3814–3825.
- Sexton, J.A., Yeo, H.-J., and Vogel, J.P. (2005) Genetic analysis of the *Legionella pneumophila* DotB ATPase reveals a role in type IV secretion system protein export. *Mol Microbiol* **57**: 70–84.
- Shevchuk, O., Batzilla, C., Hägele, S., Kusch, H., Engelmann, S., Hecker, M., *et al.* (2009) Proteomic analysis of *Legionella*-containing phagosomes isolated from *Dictyostelium*. *Int J Med Microbiol IJMM* **299**: 489–508.

- Shevchuk, O., Jäger, J., and Steinert, M. (2011) Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front Microbiol* **2**: 74.
- Shevchuk, O., Pägelow, D., Rasch, J., Döhrmann, S., Günther, G., Hoppe, J., *et al.* (2014) Polyketide synthase (PKS) reduces fusion of *Legionella pneumophila*-containing vacuoles with lysosomes and contributes to bacterial competitiveness during infection. *Int J Med Microbiol IJMM* **304**: 1169–1181.
- Shevchuk, O., Roselius, L., Günther, G., Klein, J., Jahn, D., Steinert, M., and Münch, R. (2012) InFiRe -- a novel computational method for the identification of insertion sites in transposon mutagenized bacterial genomes. *Bioinforma Oxf Engl* **28**: 306–310.
- Shevchuk, O., and Steinert, M. (2009) Screening of virulence traits in *Legionella pneumophila* and analysis of the host susceptibility to infection by using the *Dictyostelium* host model system. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **470**: 47–56.
- Shikata, M., Hayashi, N., Fujimoto, A., Nakamura, T., Matsui, N., Ishiyama, A., *et al.* (2016) The pilT gene contributes to type III ExoS effector injection into epithelial cells in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother* **22**: 216–220.
- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D., and Shuman, H.A. (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4866–4871.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., *et al.* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**: 539.
- Silveira, T.N., and Zamboni, D.S. (2010) Pore formation triggered by *Legionella* spp. is an Nlrc4 inflammasome-dependent host cell response that precedes pyroptosis. *Infect Immun* **78**: 1403–1413.
- Simon, S., Wagner, M.A., Rothmeier, E., Müller-Taubenberger, A., and Hilbi, H. (2014) Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by *Legionella* is antagonized by a translocated Ran GTPase activator. *Cell Microbiol* **16**: 977–992.
- Siryaporn, A., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., and Gitai, Z. (2014) Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 16860–16865.
- Skerker, J.M., and Berg, H.C. (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6901–6904.
- So, E.C., Mattheis, C., Tate, E.W., Frankel, G., and Schroeder, G.N. (2015) Creating a customized intracellular niche: subversion of host cell signaling by *Legionella* type IV secretion system effectors. *Can J Microbiol* **61**: 617–635.
- Sohlenkamp, C., López-Lara, I.M., and Geiger, O. (2003) Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res* **42**: 115–162.
- Springer, T.A. (2014) von Willebrand factor, Jedi knight of the bloodstream. *Blood* **124**: 1412–1425.
- Stein, M.-P., Müller, M.P., and Wandinger-Ness, A. (2012) Bacterial pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic Cph Den* **13**: 1565–1588.
- Steinert, M., Emödy, L., Amann, R., and Hacker, J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2047–2053.
- Steinert, M., Hentschel, U., and Hacker, J. (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 149–162.

- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., and Glöckner, G. (2007) *Legionella* pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol IJMM* **297**: 577–587.
- Stewart, C.R., Burnside, D.M., and Cianciotto, N.P. (2011) The surfactant of *Legionella pneumophila* is secreted in a TolC-dependent manner and is antagonistic toward other *Legionella* species. *J Bacteriol* **193**: 5971–5984.
- Stewart, C.R., Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2009) Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J Bacteriol* **191**: 1537–1546.
- Stone, B.J., and Abu Kwaik, Y. (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* **66**: 1768–1775.
- Stone, B.J., and Kwaik, Y.A. (1999) Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili. *J Bacteriol* **181**: 1395–1402.
- Stout, J., Yu, V.L., Vickers, R.M., Zuravleff, J., Best, M., Brown, A., et al. (1982) Ubiquitousness of *Legionella pneumophila* in the water supply of a hospital with endemic Legionnaires' disease. *N Engl J Med* **306**: 466–468.
- Strom, M.S., and Lory, S. (1987) Mapping of export signals of *Pseudomonas aeruginosa* pilin with alkaline phosphatase fusions. *J Bacteriol* **169**: 3181–3188.
- Strom, M.S., and Lory, S. (1991) Amino acid substitutions in pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. Effect on leader peptide cleavage, amino-terminal methylation, and pilus assembly. *J Biol Chem* **266**: 1656–1664.
- Strom, M.S., Nunn, D.N., and Lory, S. (1993) A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2404–2408.
- Sturgill-Koszycki, S., and Swanson, M.S. (2000) *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med* **192**: 1261–1272.
- Suh, J.Y., Spyropoulos, L., Keizer, D.W., Irvin, R.T., and Sykes, B.D. (2001) Backbone dynamics of receptor binding and antigenic regions of a *Pseudomonas aeruginosa* pilin monomer. *Biochemistry (Mosc)* **40**: 3985–3995.
- Sutherland, M.C., Nguyen, T.L., Tseng, V., and Vogel, J.P. (2012) The *Legionella* IcmSW complex directly interacts with DotL to mediate translocation of adaptor-dependent substrates. *PLoS Pathog* **8**: e1002910.
- Swanson, M.S., and Isberg, R.R. (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **63**: 3609–3620.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., et al. (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* **43**: D447–452.
- Tachado, S.D., Samrakandi, M.M., and Cirillo, J.D. (2008) Non-opsonic phagocytosis of *Legionella pneumophila* by macrophages is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase. *PloS One* **3**: e3324.
- Takhar, H.K., Kemp, K., Kim, M., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2013) The platform protein is essential for type IV pilus biogenesis. *J Biol Chem* **288**: 9721–9728.

- Tammam, S., Sampaleanu, L.M., Koo, J., Manoharan, K., Daubaras, M., Burrows, L.L., and Howell, P.L. (2013) PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. *J Bacteriol* **195**: 2126–2135.
- Tammam, S., Sampaleanu, L.M., Koo, J., Sundaram, P., Ayers, M., Chong, P.A., *et al.* (2011) Characterization of the PilN, PilO and PilP type IVa pilus subcomplex. *Mol Microbiol* **82**: 1496–1514.
- Tan, Y., Arnold, R.J., and Luo, Z.-Q. (2011) *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 21212–21217.
- Tang, H., Kays, M., and Prince, A. (1995) Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun* **63**: 1278–1285.
- Taylor, M., Ross, K., and Bentham, R. (2009) *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol* **58**: 538–547.
- Taylor, T.B., and Buckling, A. (2011) Selection experiments reveal trade-offs between swimming and twitching motilities in *Pseudomonas aeruginosa*. *Evol Int J Org Evol* **65**: 3060–3069.
- Thanassi, D.G., Bliska, J.B., and Christie, P.J. (2012) Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 1046–1082.
- Theaker, J.M., Tobin, J.O., Jones, S.E., Kirkpatrick, P., Vina, M.I., and Fleming, K.A. (1987) Immunohistological detection of *Legionella pneumophila* in lung sections. *J Clin Pathol* **40**: 143–146.
- Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., and Lévi, Y. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* **97**: 950–963.
- Thomas, W.E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V., and Sokurenko, E.V. (2002) Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* **109**: 913–923.
- Tossa, P., Deloge-Abarkan, M., Zmirou-Navier, D., Hartemann, P., and Mathieu, L. (2006) Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health* **6**: 112.
- Toulabi, L., Wu, X., Cheng, Y., and Mao, Y. (2013) Identification and structural characterization of a *Legionella* phosphoinositide phosphatase. *J Biol Chem* **288**: 24518–24527.
- Townsend, S.M., Kramer, N.E., Edwards, R., Baker, S., Hamlin, N., Simmonds, M., *et al.* (2001) *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**: 2894–2901.
- Trautmann, M., Lepper, P.M., and Haller, M. (2005) Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control* **33**: S41–49.
- Tsai, T.F., Finn, D.R., Plikaytis, B.D., McCauley, W., Martin, S.M., and Fraser, D.W. (1979) Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med* **90**: 509–517.
- Tyson, J.Y., Pearce, M.M., Vargas, P., Bagchi, S., Mulhern, B.J., and Cianciotto, N.P. (2013) Multiple *Legionella pneumophila* Type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, and *Naegleria lovaniensis*. *Infect Immun* **81**: 1399–1410.
- Ünal, C., Schwedhelm, K.F., Thiele, A., Weiwad, M., Schweimer, K., Frese, F., *et al.* (2011) Collagen IV-derived peptide binds hydrophobic cavity of *Legionella pneumophila* Mip and interferes with bacterial epithelial transmigration. *Cell Microbiol* **13**: 1558–1572.

- Ünala, C.M., and Steinert, M. (2014) Microbial peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases): virulence factors and potential alternative drug targets. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **78**: 544–571.
- Urwiler, S., Nyfeler, Y., Ragaz, C., Lee, H., Mueller, L.N., Aebersold, R., and Hilbi, H. (2009) Proteome analysis of *Legionella* vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic Cph Den* **10**: 76–87.
- Vandersmissen, L., De Buck, E., Saels, V., Coil, D.A., and Anné, J. (2010) A *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. *FEMS Microbiol Lett* **306**: 168–176.
- Varga, J.J., Nguyen, V., O'Brien, D.K., Rodgers, K., Walker, R.A., and Melville, S.B. (2006) Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen *Clostridium perfringens* and other *Clostridia*. *Mol Microbiol* **62**: 680–694.
- Vincent, C.D., Friedman, J.R., Jeong, K.C., Buford, E.C., Miller, J.L., and Vogel, J.P. (2006) Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol Microbiol* **62**: 1278–1291.
- Vincent, C.D., Friedman, J.R., Jeong, K.C., Sutherland, M.C., and Vogel, J.P. (2012) Identification of the DotL coupling protein subcomplex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol Microbiol* **85**: 378–391.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J., Achtman, M., and Moxon, E.R. (1993) Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **10**: 499–510.
- Viswanathan, V.K., Kurtz, S., Pedersen, L.L., Abu-Kwaik, Y., Krcmarik, K., Mody, S., and Cianciotto, N.P. (2002) The cytochrome c maturation locus of *Legionella pneumophila* promotes iron assimilation and intracellular infection and contains a strain-specific insertion sequence element. *Infect Immun* **70**: 1842–1852.
- Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K., and Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**: 873–876.
- Wagner, C., Khan, A.S., Kamphausen, T., Schmausser, B., Unal, C., Lorenz, U., *et al.* (2007) Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell Microbiol* **9**: 450–462.
- Wasilko, D.J., and Mao, Y. (2016) Exploiting the ubiquitin and phosphoinositide pathways by the *Legionella pneumophila* effector, SidC. *Curr Genet* **62**: 105–108.
- Watarai, M., Derre, I., Kirby, J., Gowney, J.D., Dietrich, W.F., and Isberg, R.R. (2001) *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med* **194**: 1081–1096.
- Watts, J.C., Hicklin, M.D., Thomason, B.M., Callaway, C.S., and Levine, A.J. (1980) Fatal pneumonia caused by *Legionella pneumophila*, serogroup 3: demonstration of the bacilli in extrathoracic organs. *Ann Intern Med* **92**: 186–188.
- Weber, S., Stirnimann, C.U., Wieser, M., Frey, D., Meier, R., Engelhardt, S., *et al.* (2014) A type IV translocated *Legionella* cysteine phytase counteracts intracellular growth restriction by phytate. *J Biol Chem* **289**: 34175–34188.
- Weber, S., Wagner, M., and Hilbi, H. (2014) Live-cell imaging of phosphoinositide dynamics and membrane architecture during *Legionella* infection. *mBio* **5**: e00839-813.
- Weber, S.S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y., and Hilbi, H. (2006) *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog* **2**: e46.

- Weinert, F.M., Mast, C.B., and Braun, D. (2011) Optical fluid and biomolecule transport with thermal fields. *Phys Chem Chem Phys PCCP* **13**: 9918–9928.
- Weisenburger, D.D., Helms, C.M., and Renner, E.D. (1981) Sporadic Legionnaires' disease. A pathologic study of 23 fatal cases. *Arch Pathol Lab Med* **105**: 130–137.
- Weissgerber, P., Faigle, M., Northoff, H., and Neumeister, B. (2003) Investigation of mechanisms involved in phagocytosis of *Legionella pneumophila* by human cells. *FEMS Microbiol Lett* **219**: 173–179.
- Wendrich, T.M., Blaha, G., Wilson, D.N., Marahiel, M.A., and Nierhaus, K.H. (2002) Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* **10**: 779–788.
- Weyand, N.J., Calton, C.M., Higashi, D.L., Kanack, K.J., and So, M. (2010) Presenilin/gamma-secretase cleaves CD46 in response to *Neisseria* infection. *J Immunol Baltim Md 1950* **184**: 694–701.
- Weyand, N.J., Lee, S.W., Higashi, D.L., Cawley, D., Yoshihara, P., and So, M. (2006) Monoclonal antibody detection of CD46 clustering beneath *Neisseria gonorrhoeae* microcolonies. *Infect Immun* **74**: 2428–2435.
- Whiley, H., and Bentham, R. (2011) *Legionella longbeachae* and legionellosis. *Emerg Infect Dis* **17**: 579–583.
- Whitchurch, C.B., Hobbs, M., Livingston, S.P., Krishnapillai, V., and Mattick, J.S. (1991) Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. *Gene* **101**: 33–44.
- Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., et al. (2004) Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **52**: 873–893.
- Whittaker, C.A., and Hynes, R.O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* **13**: 3369–3387.
- Wiater, L.A., Dunn, K., Maxfield, F.R., and Shuman, H.A. (1998) Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **66**: 4450–4460.
- Wienken, C.J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D., and Duhr, S. (2010) Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun* **1**: 100.
- Wilderman, P.J., Vasil, A.I., Martin, W.E., Murphy, R.C., and Vasil, M.L. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. *J Bacteriol* **184**: 4792–4799.
- Winn, W.C., and Myerowitz, R.L. (1981) The pathology of the *Legionella* pneumonias. A review of 74 cases and the literature. *Hum Pathol* **12**: 401–422.
- Wintermeyer, E., Flügel, M., Ott, M., Steinert, M., Rdest, U., Mann, K.H., and Hacker, J. (1994) Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **62**: 1109–1117.
- Wintermeyer, E., Ludwig, B., Steinert, M., Schmidt, B., Fischer, G., and Hacker, J. (1995) Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect Immun* **63**: 4576–4583.

- Winther-Larsen, H.C., Hegge, F.T., Wolfgang, M., Hayes, S.F., Putten, J.P. van, and Koomey, M. (2001) *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15276–15281.
- Winther-Larsen, H.C., Wolfgang, M., Dunham, S., Putten, J.P.M. van, Dorward, D., Løvold, C., *et al.* (2005) A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **56**: 903–917.
- Wolfgang, M., Putten, J.P. van, Hayes, S.F., Dorward, D., and Koomey, M. (2000) Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *EMBO J* **19**: 6408–6418.
- Wood, E., Tamborero, S., Mingarro, I., and Esteve-Gassent, M.D. (2013) BB0172, a *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein that binds integrin $\alpha 3\beta 1$. *J Bacteriol* **195**: 3320–3330.
- Xu, F., Droemann, D., Rupp, J., Shen, H., Wu, X., Goldmann, T., *et al.* (2008) Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**: 522–529.
- Xu, L., and Luo, Z.-Q. (2013) Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect Inst Pasteur* **15**: 157–167.
- Xu, L., Shen, X., Bryan, A., Banga, S., Swanson, M.S., and Luo, Z.-Q. (2010) Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector. *PLoS Pathog* **6**: e1000822.
- Yagupsky, P. (2015) *Kingella kingae*: carriage, transmission, and disease. *Clin Microbiol Rev* **28**: 54–79.
- Yagupsky, P., and Dagan, R. (1994) *Kingella kingae* bacteremia in children. *Pediatr Infect Dis J* **13**: 1148–1149.
- Yang, K. (2001) Prokaryotic calmodulins: recent developments and evolutionary implications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 457–459.
- Yasukawa, K., Martin, P., Tinsley, C.R., and Nassif, X. (2006) Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis* is negatively controlled by the pilus-retraction machinery. *Mol Microbiol* **59**: 579–589.
- Yu, N.Y., Laird, M.R., Spencer, C., and Brinkman, F.S.L. (2011) PSORTdb—an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. *Nucleic Acids Res* **39**: D241–D244.
- Yu, N.Y., Wagner, J.R., Laird, M.R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., *et al.* (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinforma Oxf Engl* **26**: 1608–1615.
- Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., *et al.* (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* **186**: 127–128.
- Zahavi, E.E., Lieberman, J.A., Donnenberg, M.S., Nitzan, M., Baruch, K., Rosenshine, I., *et al.* (2011) Bundle-forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. *Mol Biol Cell* **22**: 2436–2447.
- Zhou, Y., Yang, W., Kirberger, M., Lee, H.-W., Ayalasomayajula, G., and Yang, J.J. (2006) Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins* **65**: 643–655.
- Zhu, W., Hammad, L.A., Hsu, F., Mao, Y., and Luo, Z.-Q. (2013) Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates. *Cell Microbiol* **15**: 1783–1795.

Zolfaghar, I., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2003) Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **71**: 5389–5393.

Zusman, T., Gal-Mor, O., and Segal, G. (2002) Characterization of a *Legionella pneumophila* relA insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression. *J Bacteriol* **184**: 67–75.

8.5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>L. pneumophila</i> und <i>D. discoideum</i> .	16
Abbildung 3.2: Intrazellulärer Infektionszyklus von <i>L. pneumophila</i> .	29
Abbildung 3.3: Mechanisches Screening der <i>L. pneumophila</i> -Transposonmutanten mit Defekten in der Inhibition der phagolysosomalen Fusion.	34
Abbildung 3.4: Struktur der Typ IV Pili sowie Pilin Untereinheiten.	37
Abbildung 3.5: Modell zur Typ IV Pilus-Biogenesesystems von <i>P. aeruginosa</i> .	39
Abbildung 3.6: Elektronen mikroskopische Aufnahme von <i>L. pneumophila</i> AA100 Typ IV Pili.	42
Abbildung 5.1: Verwendete DNA und Protein Größenstandarts	50
Abbildung 5.2: Prinzip zur Herstellung von Deletionskonstrukten zur Mutagenese mittels homologer Rekombination.	70
Abbildung 6.1: Western Blot Analyse der PilY1 Expression in <i>L. pneumophila</i> Corby.	87
Abbildung 6.2: Western Blot Analyse zur zellulären Lokalisation von PilY1.	88
Abbildung 6.3: Kolokalisation von LCVs mit Lysosomen während der Infektion in <i>D. discoideum</i> .	89
Abbildung 6.4: Struktur Analyse des <i>L. pneumophila</i> PilY1 und seiner homologen Proteine.	92
Abbildung 6.5 Amplifikation des Deletionskonstrukts und Überprüfung $\Delta pilY1$ Mutanten.	93
Abbildung 6.6: Schematische Darstellung und Überprüfung der Komplementationskonstrukte.	94
Abbildung 6.7: Infektion von <i>D. discoideum</i> mit der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante.	96
Abbildung 6.8: Infektion von hum. Lungengewebe mit der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante.	97
Abbildung 6.9: Infektion von Makrophagen und Lungenepithelzellen mit der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante.	98
Abbildung 6.10: Invasion der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante in <i>D. discoideum</i> .	99
Abbildung 6.11: Adhäsion und Invasion der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante in humane Makrophagen.	100
Abbildung 6.12: Mikroskopische Validierung der Adhäsion und Invasion der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante in THP-1 Makrophagen.	101
Abbildung 6.13: Adhäsion und Invasion der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante in humane Lungenepithelzellen.	103
Abbildung 6.14: Twitching Motility der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante.	105
Abbildung 6.15: Sliding Motility der <i>L. pneumophila</i> Corby $\Delta pilY1$ Mutante.	106
Abbildung 6.16: Putative Ca^{2+} -Bindungsdomäne von <i>L. pneumophila</i> PilY1.	108
Abbildung 6.17: Aufreinigungsschritte der rekombinanten <i>L. pneumophila</i> Corby PilY1 Domäne.	109
Abbildung 6.18: Microscale Thermophorese (MST) der Ca^{2+} -Interaktion von PilY1.	110
Abbildung 7.1: Homologie-Abgleich des <i>L. pneumophila</i> PilY1.	112
Abbildung 7.2: Alignment der homologen PilT-ATPasen.	120
Abbildung 7.3: Schematische Darstellung der Funktionshypothese von PilY1 in der Pathogenität von <i>L. pneumophila</i> .	127
Abbildung 8.1: Vektorkarten der zur Mutagenese verwendeten Vektoren.	131
Abbildung 8.2: Unterschiedlich sezernierte Proteine der <i>L. pneumophila pilY1</i> negativen mini-Tn10 Transposonmutante D1 im Vergleich zum <i>L. pneumophila</i> Corby WT.	133

8.6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1: Auflistung der verwendeten Geräte	44
Tabelle 5.2: Spezielle Verbrauchsmaterialien und Chemikalien oder Reagenzien	45
Tabelle 5.3: Verwendete kommerzielle Kits	46
Tabelle 5.4: Überblick über die verwendete Software und Datenbanken	47
Tabelle 5.5: Verwendete Vektoren	47
Tabelle 5.6: Verwendete Primer	48
Tabelle 5.7: Verwendete Enzyme.....	49
Tabelle 5.7:Verwendete Antikörper	50
Tabelle 5.8: Verwendete Zellenlinien	51
Tabelle 5.9: Verwendete Bakterienstämme.....	51
Tabelle 5.10: Zusammensetzung der verwendeten <i>Legionella</i> Kulturmedien	53
Tabelle 5.11: Zusammensetzung des verwendeten Mediums für <i>E. coli</i> Stämme	53
Tabelle 5.12: Zusammensetzung der PBS-Stocklösung.....	54
Tabelle 5.13: Zusammensetzung der zur Herstellung chem.-komp. <i>E. coli</i> benötigten Puffer	54
Tabelle 5.14: Zusammensetzung des verwendeten <i>D. discoideum</i> Kulturmediums.....	56
Tabelle 5.15: Verwendete Stocklösung für 1x Soerensen-Puffer	57
Tabelle 5.16: Zusammensetzung des verwendeten Konservierungsmediums.....	58
Tabelle 5.17: Zusammensetzung des zur Infektion von HLTEs Mediums	62
Tabelle 5.18: Zusammensetzung der zur DNA-Isolierung verwendeten Lösungen.....	66
Tabelle 5.19: Zusammensetzung der zur Agarosegelelektrophorese verwendeten Lösungen	67
Tabelle 5.20: PCR-Ansatz zur Amplifikation von Genen oder spezifischen DNA Abschnitten	68
Tabelle 5.21: Kolonie PCR-Ansatz zur Überprüfung von Mutagenese Schritten.....	68
Tabelle 5.22: Ansatz für die Adenosin-Addition zur Klonierung pGEM®-T easy	71
Tabelle 5.23: Ansatz des Restriktionsverdaus von pXDC61	72
Tabelle 5.24: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Klonierung in pXDC	72
Tabelle 5.25: Ansatz des Restriktionsverdaus zur Klonierung der PilY-Domäne in pvp008 ZZ	74
Tabelle 5.26: Zusammensetzung der erstellten SDS-Polyacrylamidgele	75
Tabelle 5.27: Zusammensetzung der für die SDS-PAGE verwendeten Puffer und Lösungen.....	75
Tabelle 5.28: Zusammensetzung der für die Comassie Färbung verwendeten Lösungen.....	76
Tabelle 5.29: Zusammensetzung der benötigten Puffer zur IEF.....	77
Tabelle 5.30: Spannungsverlauf der isoelektrischen Fokussierung	77
Tabelle 5.31: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers zur 2D-Gelelektrophorese.....	78
Tabelle 5.32: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele zur 2D-Gelelektrophorese	78
Tabelle 5.34: Zusammensetzung der Gelwaschlösung	79
Tabelle 5.36: Zusammensetzung der für den Western Blot verwendeten Lösungen	81
Tabelle 5.37: Zusammensetzung des Lysispuffers	84
Tabelle 6.1: Im Sekretom signifikant akkumulierte Proteine mit Signalsequenz.....	90
Tabelle 8.1: Im Sekretom signifikant akkumulierte Proteine	132